

# **GYÓGYHATÁSÚ PEPTIDEK TERVEZÉSE, ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA**

**AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Zarándi Márta**

**Szegedi Tudományegyetem  
Orvosi Vegytani Intézet  
2007**





# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	1
<b>I BEVEZETÉS</b>	3
<b>II AZ IRODALMI HÁTTÉR ISMERTETÉSE</b>	6
<b>II. 1. GH-RH</b>	6
II. 1. 1. A releasing hormonok felfedezése	6
II. 1. 2. A GH-RH felfedezése	6
II. 1. 3. A GH-RH antagonisták biológiai szerepe/ fontossága	8
II. 1. 4. A GH-RH receptorok	9
<b>II. 2. ALZHEIMER-KÓR</b>	10
II. 2. 1. Alzheimer-kór kialakulása	10
II. 2. 2. Az amiloid plakkok összetétele	11
II. 2. 3. Az A $\beta$ peptidek keletkezése	12
II. 2. 4. Amiloid aggregátumok	13
II. 2. 5. Az AD kialakulásával és patomechanizmusával kapcsolatos elképzelések	14
II. 2. 5. 1. Az amiloid kaszkád hipotézis	14
II. 2. 5. 2. Tau hipotézis	15
II. 2. 5. 3. Neurovaszkuláris hipotézis	18
II. 2. 5. 4. Sejtciklus hipotézis	18
II. 2. 5. 5. Az ubiquitin-proteaszom rendszer szerepe	19
II. 2. 6. Az A $\beta$ kapcsolata fehérjékkel	20
II. 2. 7. Az AD terápiás lehetőségei	20
<b>III CÉLKITŰZÉSEK</b>	24
<b>IV ANYAG ÉS MÓDSZEREK</b>	25
<b>IV. 1. PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA</b>	25
IV. 1. 1. GH-RH antagonisták és antigének előállítása	25
IV. 1. 2. GH-RH-R és SV antiszérumok előállítása	26
IV. 1. 3. A $\beta$ peptidek előállítása	26
IV. 1. 4. Fluoreszcens jelölt peptidek előállítása	28
<b>IV. 2. PEPTIDEK HASÍTÁSA A HORDOZÓRÓL</b>	28
IV. 2. 1. GH-RH antagonisták	28
IV. 2. 2. A $\beta$ peptidek	29
<b>IV. 3. PEPTIDEK TISZTÍTÁSA</b>	29
IV. 3. 1. GH-RH antagonisták	29
IV. 3. 2. A $\beta$ peptidek	29
<b>IV. 4. PEPTIDEK ANALÍZISE ÉS AZONOSÍTÁSA</b>	30
<b>IV. 5. PEPTIDTARTALOM MEGHATÁROZÁSA</b>	30
<b>IV. 6. IN VITRO BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK</b>	31
IV. 6. 1. GH-RH antagonisták vizsgálata	31
IV. 6. 1. 1. Szuperfúziós vizsgálatok	31
IV. 6. 1. 2. Kötődési vizsgálatok	31
IV. 6. 1. 3. Proliferációs vizsgálatok	32

IV. 6. 1. 4. IGF-I és IGF-II meghatározása	32
IV. 6. 1. 5. Reverz transzkripció PCR (RT-PCR) vizsgálatok, Southern-blot analízis, Northern-blot analízis	32
IV. 6. 2. A $\beta$ peptidek vizsgálata	32
IV. 6. 2. 1. Neurotoxicitás és neuroprotektív hatás vizsgálata MTT teszttel	32
IV. 6. 2. 2. Fluoreszcencia mérések	32
IV. 6. 2. 3. FT-IR mérések	34
IV. 6. 2. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	34
IV. 6. 2. 5. Dinamikus fényszóródás mérés	34
IV. 6. 2. 6. Kongóvíz kötődési vizsgálatok	35
IV. 6. 2. 7. Stabilitás vizsgálatok	35
IV. 6. 2. 8. Elektrofiziológiai mérések	35
<b>IV. 7. IN VIVO BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK</b>	36
IV. 7. 1. GH-RH antagonisták in vivo vizsgálata	36
IV. 7. 1. 1. GH felszabadulás gátlása	36
IV. 7. 1. 2. Krónikus kezelés GH-RH antagonistával	36
IV. 7. 1. 3. Onkológiai tesztek	37
IV. 7. 2. A $\beta$ peptidek in vivo vizsgálata	38
IV. 7. 2. 1. Extracelluláris egysejt-elvezetési elektrofiziológiai mérések	38
IV. 7. 2. 2. Mikrodialízis	38
IV. 7. 2. 3. Viselkedési tesztek	39
<b>V EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK</b>	40
<b>V. 1. GH-RH PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA</b>	40
V. 1. 1. GH-RH antagonisták első sorozatának előállítása és vizsgálata	40
V. 1. 1. 1. Peptidek tervezése és előállítása	40
V. 1. 1. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok	41
V. 1. 1. 3. Az in vitro leghatásosabb GH-RH antagonisták in vivo vizsgálata	43
V. 1. 1. 4. Az in vivo leghatásosabb antagonista onkológiai vizsgálata	44
V. 1. 2. Hidrofób aminosavak és citrullin beépítése	46
V. 1. 2. 1. Tervezés és előállítás	46
V. 1. 2. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok	48
V. 1. 2. 3. Az in vitro leghatásosabb GH-RH antagonisták in vivo vizsgálata	51
V. 1. 2. 4. Az MZ-5-156 antagonista onkológiai vizsgálata	53
V. 1. 3. GH-RH antagonisták ornitin helyettesítésekkel vagy laktámmal	55
V. 1. 3. 1. Peptidek tervezése és előállítása	55
V. 1. 3. 2. Az Orn helyettesítéseket és laktámmal tartalmazó GH-RH antagonisták in vitro biológiai vizsgálata	56
V. 1. 4. GH-RH antagonisták módosításai az N-terminálison és környékén	57
V. 1. 4. 1. Peptidek tervezése és előállítása	57
V. 1. 4. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok	57
V. 1. 4. 3. In vivo vizsgálatok	58



V. 1. 5. Változtatások a C-terminálison és Arg cserék	58
V. 1. 5. 1. <i>Peptidek tervezése és előállítása</i>	58
V. 1. 5. 2. <i>In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok</i>	59
5. 1. 5. 3. <i>Az in vitro leghatásosabb GH-RH antagonisták in vivo vizsgálata</i>	60
5. 1. 5. 4. <i>Onkológiai vizsgálatok</i>	60
V. 1. 6. A 8, 9 és 10-es aminosavak cseréje	61
V. 1. 6. 1. <i>Peptidek tervezése és előállítása</i>	61
V. 1. 6. 2. <i>In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok</i>	61
V. 1. 6. 3. <i>In vivo vizsgálatok</i>	62
V. 1. 6. 4. <i>Onkológiai vizsgálatok</i>	63
V. 1. 7. Zsírsvakkal történő acilezések GH-RH antagonistákban	63
V. 1. 7. 1. <i>Peptidek tervezése és előállítása</i>	63
V. 1. 7. 2. <i>In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok</i>	64
V. 1. 7. 3. <i>In vivo vizsgálatok</i>	66
V. 1. 7. 4. <i>Onkológiai vizsgálatok</i>	66
V. 1. 8. Helyettesítések és acilezések kombinálása	67
V. 1. 8. 1. <i>Peptidek tervezése és előállítása</i>	67
V. 1. 8. 2. <i>In vitro vizsgálatok</i>	67
V. 1. 8. 3. <i>In vivo vizsgálatok</i>	68
V. 1. 8. 4. <i>Onkológiai vizsgálatok</i>	68
V. 1. 9. GH-RH és SV <sub>1</sub> receptor antigének és poliklonális antitestek előállítása	70
V. 1. 10. GH-RH antagonisták tumornövekedést gátló hatásának mechanizmusa	71
<b>V. 2. Aβ(1-42) ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA</b>	73
V. 2. 1. Szintézis	73
V. 2. 2. MTT teszt	75
V. 2. 3. Sejten belüli Ca <sup>2+</sup> mérése/Fluoreszcencia mérések	76
V. 2. 4. Aggregációs vizsgálatok	77
V. 2. 4. 1. <i>TEM vizsgálatok</i>	78
V. 2. 4. 2. <i>Dinamikus fényszóródás mérés (DLS)</i>	78
V. 2. 4. 3. <i>FT-IR vizsgálatok</i>	79
V. 2. 5. Stabilitás vizsgálatok	80
V. 2. 6. Fluoreszcens-jelölt peptidek előállítása	80
<b>V. 3. NEUROPROTEKTÍV PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA</b>	81
V. 3. 1. Funkcionális antagonisták	81
V. 3. 2. Aggregációs inhibitorok	85
V. 3. 3. β-Szerkezetromboló (BSB) peptidek	87
V. 3. 4. Az endomorfín-2 védő hatása	89
<b>V. 4. HATÁSMECHANIZMUS</b>	89
V. 4. 1. RIIGL <sub>a</sub> hatása az aggregációra	89
V. 4. 2. Aβ kölcsönhatása sejtmembránokkal, szignalizáció	91
<b>VI AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNA</b>	92
<b>VII ÖSSZEFOGLALÁS</b>	93
<b>VIII IRODALOMJEGYZÉK</b>	96
<b>IX KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	110

## Rövidítések jegyzéke

AAI	amiloid aggregációs inhibitor
A $\beta$	béta-amiloid
ACTH	adrenokortikotróp hormon
AD	Alzheimer-kór
ADDL	amiloid eredetű diffúzibilis ligandumok (amyloid derived diffusible ligands)
Agm	agmatin (1-amino-4-guanidino-bután)
Alloc	alliloxikarbonil
AMCA	7-amino-4-metil-3-kumarinil-ecetsavat
Amp	<i>para</i> -amidino-fenilalanin
APP	amiloid prekursor fehérje
BACE	A $\beta$ hasító enzim
BOP	benzotriazolil-oxi-trisz(dimetilamino)foszfónium-hexafluorofoszfát
BSA	marhaszérum albumin
BSB	béta-szerkezet romboló ( $\beta$ -sheet breaker)
Cha	ciklohexil-alanin
COX	ciklooxigenáz
DCM	diklórmétán
Dip	3,3'-difenil-alanin
DLS	dinamikus fényszóródás mérés
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
Et	etil
FAD	familiáris AD
FAM	5(6)-karboxi-fluoreszcein
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FSH	follikulusz stimuláló hormon
GH	növekedési hormon (growth hormone)
GH-RH	növekedési hormont felszabadító hormon (growth hormone-releasing hormone)
GH-RH-R	GH-RH receptor
GnRH	gonadotróp hormon-releasing hormon
Har	homoarginin
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónium-hexafluorofoszfát
hGH-RH	humán GH-RH
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
Hyp	4-hidrox-Pro
IGF	inzulin-szerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
i.p.	intraperitoneális
i.v.	intravénás
KLH	keyhole lymphet hemocianin
LH	luteinizáló hormon
LH-RH	luteinizáló hormon-releasing hormon
MBHA	<i>para</i> -metil-benzhidrilamin
Me	metil

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólium-bromid
Nac	1-naftil-acetil
Nic	nikotinoil
NMDA	N-metil-D-Asp
NSCLC	nem kissejtes tüdőrák
OPA	<i>orto</i> -ftálaldehid
PBSA	foszfát puffer /NaCl
Ph( <i>p</i> OH)Ac	<i>para</i> -hidroxifenilacetil
PEA	β-fenil-etilamin
RIA	radioimmunassay
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
s.c.	szubkután
SCLC	kissejtes tüdőrák
SS	szomatosztatin (growth hormon release-inhibiting hormon)
St	standard
SV	„splice” variáns
Tic	1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-3-karbonsav
TRH	tireotróp-releasing hormon
VIP	vazoaktív intesztinális peptid



## I BEVEZETÉS

Az első szintetikus peptideket Emil Fischer állította elő több mint 100 évvel ezelőtt. Az orvosi gyakorlatban azonban csak a II. világháború után kezdtek peptideket alkalmazni, miután du Vigneaud csoportja, majd később Schwyzer (Ciba) és Huguenin (Sandoz) kémiai szintézissel tiszta oxitocint állítottak elő. A peptidek szintézise ekkor még hosszadalmas volt a hagyományos oldat fázisú módszerrel, esetenként 1-2 évig is eltartott egy-egy peptid előállítása. Bruce Merrifield új módszere, a szilárd fázisú peptidszintézis, forradalmasította és automatizálhatóvá tette a peptidek előállítását (1). A módszer elterjedt és elősegítette új tisztítási eljárások kidolgozását (HPLC).

A hatvanas évektől a peptideket a jövő gyógyszereinek gondolták, bár hátrányuk volt a kismértékű biológiai hozzáférhetőség. Ezen kívül több, peptid gyógyszerek kifejlesztésébe investáló gyógyszercég kénytelen volt a további fejlesztést az utolsó klinikai fázisokban különböző okok miatt elvetni. Ezért a gyógyszergyártó cégek érdeklődése a peptidomimetikumok fejlesztése felé irányult. Később új, érdekes farmakológiai hatású peptidek izolálása és a szilárd fázisú peptidszintézis módszer optimalizálása révén lehetővé vált nagy peptidek és kis fehérjék előállítása újabb lendületet adott a peptidek ipari előállításának és felhasználásának.

A peptidek gyógyszerként történő felhasználásának a számos előny – mint pl. a nagy specificitás és a magas aktivitás miatt csak kis dózist kell alkalmazni, viszonylag kicsi toxicitás és kevés mellékhatás stb. – mellett hátrányai is vannak. Pl. a szervezetben általában rövid a fél-életidejük és a szervezetbe bejuttatásuk rendszerint speciális formulázást igényel, valamint ipari szempontból hátrány, hogy viszonylag kis mennyiséget kell a peptidekből gyártani, de az előállítás költségei magasak.

A hátrányok ellenére a századfordulón már a világ gyógyszeriparának kb. 265 milliárd USA dollár bevételeből 28 milliárd dollár a peptidek és fehérjék forgalmazásából származott. Az utóbbi 10 évben kb. 35-40 új vegyület kerül gyógyszerként bevezetésre évente és ezek között a peptidek száma egyre növekszik (2).

Napjainkban már számos betegség kezelésére és diagnosztikus célokra javasolnak peptideket és fehérjéket, közöttük rekombináns technikával előállítottakat is, valamint

monoklonális antitesteket. A peptid gyógyszerek között szerepelnek többek között LH-RH agonisták, amelyeket endokrin tumorok, elsősorban prosztatata- és emlőrák kezelésére alkalmaznak; szomatosztatin analógok (szintén daganatos betegségek kezelésére); angiotenzin konvertáló enzim (ACE) inhibitorok (magas vérnyomás kezelésére), kalcitonin (oszteoporózis kezelésére). Forgalomban vannak vazopresszin analógok, antikoaguláns peptid származékok, HIV proteáz inhibitorok és immunstimuláló peptidek is (2). A humán angiotenzint, oxitocint és ACTH-t is a mai napig termelik és forgalmazzák (2). A közelmúltban piacra bocsátott peptidgyógyszerek között magyar vonatkozású is van, az LH-RH antagonistá Cetorelix (3, 4).

A gyógyszerként forgalomban lévő peptidek felsorolása korántsem teljes, csak néhány kiragadott példával szerettem volna illusztrálni a peptidek fontosságát a gyógyászatban, amely egyúttal indokolja választott témám fontosságát a klinikumban.

Az átlag életkor növekedése következtében különösen Nyugat-Európában, USA-ban és Japánban az időskor egyre hosszabb életszakaszt jelent. Ez viszont maga után vonja bizonyos betegségek gyakoriságának a növekedését is, többek között a magas vérnyomás, a szív- és érrendszeri betegségek, autoimmun betegségek, cukorbetegség, oszteoporózis, a malignus kórképek sokkal gyakoribbak idős korúak között és ugyancsak tipikusan időskori neurodegeneratív megbetegedés az Alzheimer-kór (AD) is. Értekezésemben a két utóbbi, idős korban különösen gyakori betegség - a daganatos megbetegedések és az AD - peptidekkel történő gyógyításának új lehetőségeivel kapcsolatos kutatási eredményeinket ismertetem. A rosszindulatú daganatos betegségek egyre nagyobb fenyegetettséget jelentenek, mert a gyakoriságuk folyamatosan növekszik. A kutatások fontosságára utal az a tény, hogy világszerte mintegy 10 millió új tumoros beteget diagnosztizálnak évente és kb. 6 millióan halnak meg évente daganatos betegségben. Statisztikai becslések szerint a daganatos betegek száma 2050-re csaknem megduplázódik. Magyarország a tumoros megbetegedések előfordulásában és halálozási adatok tekintetében az elsők között szerepel a világon. Egyes daganatos betegségeknek új gyógyszerei lehetnek a növekedési hormont felszabadító hormon (growth hormone-releasing hormone, GH-RH) antagonistá analógok, ezek tervezésével, előállításával és vizsgálatával kapcsolatos kutatásainkról számolok be értekezésemben.

Az időskorúak körében gyakran előforduló szenilis demenciák (5) vezető oka az Alzheimer-kór (AD). A 65 éves korúak között még csak kb. 2-3%, de a 85 éves

korosztályban már 25-50 % gyakoriságú (6) ez a mentális leépüléssel járó betegség. Az AD előfordulása exponenciálisan növekszik a korral, ma világszerte kb. 15 millió beteg van, 2020-ra 29 millióra becsülik a számukat, 2050-re pedig megközelítik a 100 milliót a világon (7). A magatehetetlen, idős betegek ellátása világszerte óriási terhet jelent a családoknak és a társadalomnak. A betegség gyógyszeres kezelése még mindig nem megoldott. Az AD potenciális új gyógyszerei lehetnek többek között az általunk előállított és vizsgált béta-amiloid peptid ( $A\beta$ ) rövid fragmensei ill. ezek analógjai.



## II AZ IRODALMI HÁTTÉR ISMERTETÉSE

### II. 1. GH-RH

#### II. 1. 1. A releasing hormonok felfedezése

A hipotalamuszban termelődő és a későbbiekben „releasing” és „inhibiting” faktoroknak nevezett anyagok izolálásával és kémiai jellemzésével vette kezdetét a modern neuroendokrinológia. Mivel ezek a peptidek a hipofízisbe jutva serkentik vagy gátolják annak hormontermelését és ürülését, a későbbiekben „releasing” és „inhibiting” hormonoknak nevezték el őket. Az 50-es éveket követő három évtizedben különböző kutatócsoportok munkája eredményeként több serkentő (releasing) és gátló (inhibiting) hormont sikerült izolálni és szerkezetüket azonosítani, mint pl. a tireotrop-releasing hormont (TRH), a luteinizáló hormon-releasing hormont (LH-RH), a növekedési hormon release-inhibiting hormont vagy szomatosztatint (SS) és a növekedési hormont felszabadító hormont (growth hormon-releasing hormon, GH-RH).

A 60-as években több kutatócsoport versenyzett az LH és FSH releasing faktorok izolálásáért. Elsőként A.V. Schally kutatócsoportja izolálta 1971-ben sertés hipotalamuszból az LH-RH-t és a szerkezet azonosítást (8, 9) követően megállapították, hogy ez a 10 aminosavból álló peptid mindkét gonadotrop hormonnak, az LH-nak és FSH-nak is közös releasing hormonja (10), tehát mind LH-RH-nak, mind gonadotrop hormon-releasing hormonnak (GnRH) is nevezhető. Schally csoportjától függetlenül, Guillemin kutatócsoportja egy évvel később azonos szerkezetű releasing faktort különített el birka hipotalamuszból (11). A releasing hormonok kutatásában kifejtett munkásságukért Schally és Guillemin 1977-ben Nobel-díjat kaptak.

#### II. 1. 2. A GH-RH felfedezése

Emlősök hipotalamuszából nyert extraktumok biológiai vizsgálatával már az 1960-as évek végén sikerült kimutatni a GH-RH hatást (12), de magát a humán GH-RH-t (hGH-RH) csak 1982-ben izolálta egymástól függetlenül két munkacsoport hasnyálmirigy



tumorból és a peptidhormon szerkezetét is azonosították (13, 14). Rivier munkacsoportja egy 40 aminosavból álló, a C-terminálison szabad karboxil csoportot tartalmazó peptidet, míg a Guillemin-csoport három peptidet (GH-RH(1-37)-OH, GH-RH(1-40)-OH és GH-RH(1-44)-NH<sub>2</sub>) azonosított. Guilleminék megállapítása szerint a rövidebb peptidek a 44 aminosavból álló GH-RH degradációs termékei. Később bizonyították, hogy a humán hipotalamusz GH-RH szekvenciája azonos a pancreas tumorból izolálttal (15, 16) (**1. ábra**). A GH-RH a hipotalamuszban termelődik és a hipofízis elülső lebenyében lévő receptorokhoz kapcsolódva stimulálja a növekedési hormon (growth hormone, GH) szintézisét és szekrécióját (17). Más neuropeptidekhez hasonlóan a GH-RH(1-44)-NH<sub>2</sub> néhány, a hipotalamuszon kívüli szövetben is termelődik, többek között a placentában (18), ováriumban (19), tesztiszben (20), gasztrointesztinális szervekben (21), de ezekben még nem tisztázott a szerepe.

Tyr-Ala Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-  
Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-  
Arg-Ala-Arg-Leu

**YDAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRRQGESNQERGARARL**

**1. ábra**      A hGH-RH(1-44) szekvenciája.

A GH-RH felfedezését és azonosítását követően elkezdett kutatások a peptidhormon aktív centrumának felderítését tűzték ki célul. A vizsgálatok szerint a molekula N-terminális 29 aminosava még rendelkezik a teljes intrinsic aktivitással (22-24). A különböző kutatócsoportokban előállított több száz agonista ennek a 29 aminosav hosszú szekvenciának az analógja. Ezek tervezésének és előállításának az volt a célja, hogy a natív hormonnál hatásosabb analógok később a klinikumban felhasználhatók legyenek különféle betegségek kezelésére. A GH-RH agonisták a hipotalamikus eredetű törpenövés és egyéb GH hiánnyal járó kórképek kezelése mellett alkalmasak a sebgyógyulás elősegítésére és általános roborálóként is használhatók (25).

## II. 1. 3. A GH-RH antagonisták biológiai szerepe/ fontossága

[A szögletes zárójelben található számok a témában megjelent közlemények sorszámát jelzik.]

A nagy számú szintetikus GH-RH agonista analóg biológiai vizsgálata során kiderült, hogy a 2-es pozícióban lévő Ala-t D-Arg-re cserélve antagonistá hatású vegyülethez jutottak (26). Az irodalomban leírt első GH-RH antagonistá az  $[N\text{-Ac-Tyr}^1, \text{D-Arg}^2]\text{hGH-RH}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$  gátolta a GH-RH által stimulált adenil-cikláz aktivitást patkány hipofízis sejtekben (26), a GH felszabadulást sejt kultúrában és csökkentette a GH felszabadulást patkányokban (27, 28). A GH-RH antagonistá analógjainak a GH-RH hatásmechanizmusának tanulmányozása mellett fontos szerepe lehet a klinikumban, elsődlegesen a GH-RH/GH túlermeléssel járó kórképekben, mint pl. akromegália, diabéteszes retinopátia és nefropátia (glomeruloszklerózis) esetén, amikor a szérumban GH szint csökkentése kívánatos.

A GH-RH antagonisták legfontosabb alkalmazása a daganatos betegségek gyógyításában lehet (29, 30). Az inzulin-szerű növekedési faktor I-nek (insulin-like growth factor-I, IGF-I) és IGF-II-nek szerepe van bizonyos sejtek malignus átalakulásában (31-33), különféle tumorok progresszójában és a metasztázisok kialakulásában (34).

A 90-es években Schally feltételezte, hogy a GH-RH antagonisták a hipofízisben a GH és IGF szekréció gátlása révén csökkenthetik a különböző, IGF receptorral bíró, vagy IGF-okat termelő daganatok növekedését (35). Az IGF szintek csökkentésén kívül, a tumor sejt proliferációban növekedési faktorként szereplő GH-RH hatásainak gátlásával alkalmasak lehetnek az antagonisták a GH-RH-t termelő és/vagy annak receptorát kifejező tumorok növekedésének gátlására is (35). Bár a GH-RH antagonistáknak már a 90-es évek elején feltételezték a szerepét a daganatos betegségek kezelésében és gyógyításában, a viszonylag gyenge antagonistá hatással rendelkező  $[N\text{-Ac-Tyr}^1, \text{D-Arg}^2]\text{hGH-RH}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$  nem volt alkalmas a hipotézis igazolására. A bizonyítás mindaddig váratott magára, amíg Schally csoportja új, nagyhatású GH-RH antagonistákat nem szintetizált [1]. Új GH-RH antagonisták tervezésébe és szintetizálásába 1992-ben kapcsolódtam be és néhány nagy hatású, új GH-RH antagonistákkal Schally csoportja először bizonyította, hogy tumorok növekedése *in vitro* és *in vivo* gátolható ezekkel a származékokkal [2, 3]. Az  $[N\text{-Ac-Tyr}^1, \text{D-Arg}^2]\text{hGH-RH}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$  nagy dóziséval (400 µg/kg) végzett klinikai vizsgálatokban azt



találták, hogy az antagonista gátolta a GH szekréciót és a GH-RH választ normál egyéneknél (36), valamint csökkentette a GH szintet akromegáliás betegekben (37).

A szomatosztatin, amely ugyancsak elnyomja a GH/IGF-I utat, képes csökkenteni immunhiányos egerekbe implantált tumorok növekedését (38). Nagymértékben növeli a GH-RH antagonisták potenciális szerepét a klinikumban az, hogy IGF-I függő rákos betegekben a szomatosztatin analógok nem elég hatásosan csökkentik a GH és IGF-I szinteket (39) és egyes tumorok nem rendelkeznek szomatosztatin receptorokkal.

## II. 1. 4. A GH-RH receptorok

A hipofízis GH-RH receptorral (GH-RH-R) kapcsolatos első kutatások K.E. Mayo nevéhez fűződnek (40). Kutatócsoportja először patkány hipofízisből különített el polimeráz láncreakcióval egy új cDNS-t, majd homológiát humán veséből, amely nagy affinitással és specificitással kötötte a hGH-RH-t. A cDNS által kódolt receptor 7 transzmembrán domént tartalmaz, tehát a G-fehérjékhez kapcsolt receptor fehérjék családjába tartozik (40) és 47% homológiát mutat a VIP receptor fehérjével (41, 42). Mayo eredményei értelmezték a GH-RH jelentőségét a sejt szignalizációs folyamatokban és elősegítették a GH-RH-R szerepének tisztázását a GH-függő növekedési zavarokban.

A GH-RH-R jelenlétét számos, hipotalamuszon kívüli humán szövetben is igazolták, mint pl. a placentában (18), ováriumban (19, 42), egyéb szövetekben (43), valamint humán emlő-, petefészek- és endometriumtumorban (44), limfómában és tüdőrákban (45) [4].

A GH-RH és a vazóaktív intesztinális peptid (VIP) hasonló szerkezete miatt a GH-RH antagonisták elvileg a VIP receptorhoz is kötődhetnek. Ennek ellene szól az a tény, hogy a GH-RH antagonisták gátolják a VIP receptorokat nem expresszáló MiaPaCa-2 humán pancreas tumor sejtek proliferációját *in vitro* (46). Ezen kívül a GH-RH antagonisták sokkal hatásosabban gátolják az LNCaP humán prosztaták sejtek proliferációját, amelyekben megtalálhatók a VIP receptorok, mint a VIP antagonisták (46).

Ezek és egyéb eredmények (30, 47-51) [2] felvetették specifikus receptorok jelenlétének lehetőségét humán tumorokban, amelyekhez a GH-RH antagonisták kötődnek.

A GH-RH-R „splice” variánsait (SV) humán hipofízis adenomában (52, 53) és olyan betegekben találták meg először, akik mutáns GH-RH receptor génnel rendelkeztek (54). Schally csoportjának sikerült 2000-ben először kimutatni hipofízisen kívüli normál és

malignus tumor sejtekben (LNCaP prosztatata, MiaPaCa-2 pancreas, MDA-MB-468 emlő, OV-1063 ovarium és H-69 kissejtes tüdőrák) a GH-RH-R 4 splice variánsát és az ezeket a receptorokat kódoló cDNS szekvencia analízisét is elvégezték (55). A GH-RH SV receptorai különböznek a hipofízisben expresszálandó receptortól. Ezeket több humán tumorban (55, 56) és néhány normál szövetben is megtalálták (55). A leggyakrabban előforduló SV<sub>1</sub> receptor mutat legnagyobb hasonlóságot a teljes hosszúságú GH-RH receptor aminosav szekvenciájával, de a GH-RH-R N-terminális extracelluláris doménjének első 89 aminosavát egy ettől különböző 25 aminosavból álló szekvencia helyettesíti (55).

Humán pancreas-, vastagbél- és gyomorrák sejtvonalakban is kimutatták a GH-RH-R és SV-k expresszióját. Ezekkel a rákos sejtvonalakkal végzett *in vitro* kísérletekben a GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> stimulálta a sejtek proliferációját, de ez GH-RH antagonistával gátolható volt (57). Az eredmények a rákos sejtekben kifejeződő, a GH-RH-R és SV receptorokkal kapcsolatos autokrin/parakrin stimuláló útra utalnak, amely alapja lehet olyan tumor ellenes terápiának, amely a GH-RH antagonistáknak ezeken a receptorokon kifejtett hatásán alapul (57).

## II. 2. ALZHEIMER-KÓR

### II. 2. 1. Alzheimer-kór kialakulása

Száz évvel ezelőtt írta le először Alois Alzheimer a később róla elnevezett betegséget (58). Az AD egy progresszív neurodegeneratív betegség, amely teljes mentális leépüléshez és mintegy 10 év alatt halálhoz vezet. A betegségre kezdetben a felejtés és tévesztés, majd a memória és a kognitív funkciók kiesése és az érzelmi egyensúly fokozatos elvesztése jellemző. A neurodegeneráció az AD klinikai tüneteinek megjelenése előtt mintegy 20-30 évvel elkezdődik (59).

Az időskoron kívül más rizikótényezők is szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában: pl. az alacsony mentális képességek a korai életszakaszban, csökkent mentális és fizikai aktivitás időskorban (60, 61), fejsérülések (62), vaszkuláris betegségek és diabétesz (60). Környezeti hatások is növelhetik a sporadikus AD rizikóját, de ikrekkel végzett tanulmányok szerint a betegség közel 80 %-ban genetikailag öröklött (63).

Az AD pathomechanizmusa még ma sem ismert teljesen és hatásos gyógyszere sincs. Az viszont ismert, hogy a beteg emberek központi idegrendszerében számos patológiai és biokémiai elváltozás található. Kezdetben a kolinerg sejtek, majd a többi idegsejt is károsodik; ú.n. amiloid plakkok jelennek meg (64), ezek közepén 39-43 aminosavból álló  $\beta$ -amiloid peptidek ( $A\beta$ ) aggregátumai (65) találhatók, valamint a tau-fehérjék hiperfoszforilációja is végbemegy az agyban (66). A neurofibrilláris fonatok megjelenése a mitokondriumok károsodását vonja maga után, majd a teljes agyi leépülés halálhoz vezet.

A mai elfogadott nézet szerint az Alzheimer-kór kialakulásában döntő szerepe van egy különleges membránfehérjének, az amiloid prekursor proteinnek (APP). Az APP-ből enzimhasítással képződő 39-43 aminosavból álló  $A\beta$  peptidek neurotoxikus hatása ma már bizonyított, de a pontos hatásmechanizmus még nem ismert annak ellenére, hogy már számos adat áll rendelkezésünkre: az  $A\beta$  peptidek 1) receptor fehérjékhez kötődve hamis szignál transzdukciós utakat aktiválnak, amely apoptózishoz vezethet (67-74); 2) ioncsatornák megnyitásával megváltoztatják a sejtmembrán szerkezetét, depolarizációt okoznak, amely a szignál transzdukció kóros szabályozásához vezet (75); 3) szabad gyökök létrehozásával oxidatív stresszt indukálnak, amely mitokondriális diszfunkcióhoz vezet (76, 77) és 4) az erek endotél sejtjeivel kapcsolatba lépve szuperoxid gyököket hoznak létre, amelyek oxidáló hatású ágensek képzése révén lipid peroxidációt és más degeneratív változásokat okoznak (78).

(Az AD pathomechanizmusával kapcsolatos hipotéziseket egy későbbi fejezetben ismertetem.)

## **II. 2. 2. Az amiloid plakkok összetétele**

Az AD betegek agyában plakkok és neurofibrilláris fonatok találhatók (79). Az amiloid plakkok főként aggregált  $A\beta$ -t tartalmaznak és mivel gyakorlatilag oldhatatlanok, az összetételüket és a fő komponensüknek, az  $A\beta$ -nak aminosav szekvenciáját csak az 1980-as évek közepén sikerült meghatározni (80). Kezdetben azt gondolták, hogy a plakkokban található  $A\beta$  egy abnormális fehérje része, ezért fontos felfedezés volt, amikor kimutatták, hogy az  $A\beta$  normális sejt metabolizmus során is folyamatosan keletkezik (81). Az  $A\beta$  plakkokban való kimutatásával csaknem párhuzamosan bizonyították, hogy a neurofibrilláris kötegeket páros helikális filamentumok alkotják, amelyek abnormálisan



foszforilált tau fehérjékből állnak (66, 82). Azt viszont ma sem tudjuk még, hogy a hiperfoszforiláció és a kötegek kialakulása oka, vagy következménye az AD-nek.

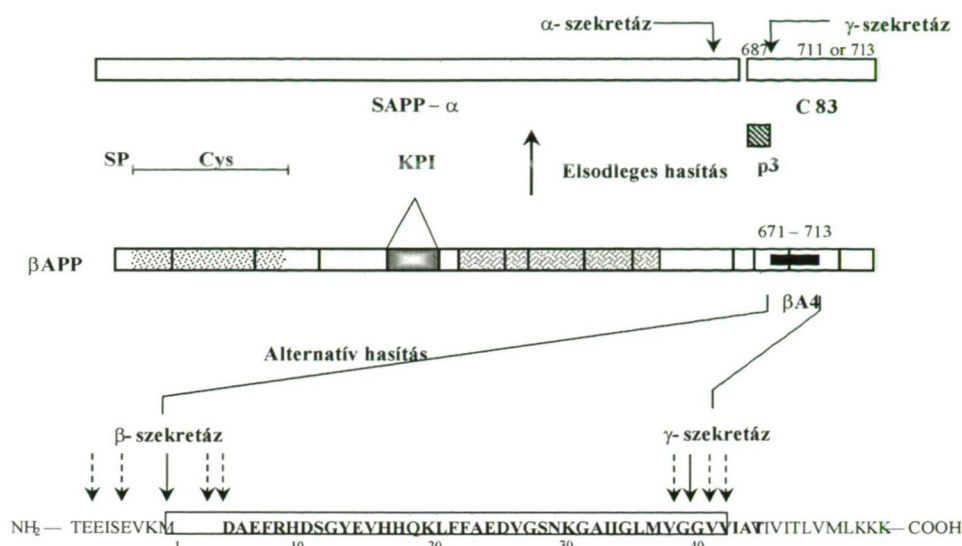
Azt is kimutatták, hogy az amiloid plakkokban megtalálható vaszkuláris endotél növekedési faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) neurotrofikus és neuroprotektív hatással is rendelkezik az ischémiás, valamint a glutamát által okozott excitotoxikus hatás ellen (83, 84).

A legújabb kutatási eredmények egy új fehérjét mutattak ki az AD betegek agyában található plakkokban: a kollagénes Alzheimer amiloid plakk komponens (CLAC), amely egy transzmembrán kollagén fehérjéből, a CLAC-P-ből keletkezik (85, 86). Még nem ismert a CLAC szerepe az AD patomechanizmusában és a plakkok kialakulásában.

### **II. 2. 3. Az A $\beta$ peptidek keletkezése**

Az A $\beta$  peptidek egy 695 ill. 770 aminosavból álló, neuroprotektív hatású transzmembrán fehérjének, az APP-nek (87) először  $\beta$ -, majd  $\gamma$ -szekretáz enzimekkel történő alternatív hasításakor keletkeznek (2. ábra) (88, 89). A  $\beta$ -szekretáz enzim („beta-site APP-cleaving enzyme”, BACE 1) (90) az APP-t az A $\beta$  N-terminálisánál hasítja és a legújabb eredmények szerint a hipoxia fokozza a BACE1 gén expresszióját, amely a  $\beta$ -szekretáz enzim aktivitásának növekedését és ezáltal az A $\beta$  termelődését fokozza (91). Először a preszenilineket (PS1 és PS2) azonosították  $\gamma$ -szekretáz enzimként (92), de a legújabb kutatási eredmények szerint a preszenilinek egy tetramer komplex részei, amely a nicastrin fehérjét, anterior pharynx-hiányos fenotípusú fehérjét (Aph 1) és a preszenilinek működését fokozó Pen 2-t is tartalmazza (93).

Az  $\alpha$ -szekretáz enzimnek az APP 687. aminosavánál történő hasítása egy oldható fragmenst (APP<sub>s</sub>- $\alpha$ ) és egy, a membránban maradó C-terminális fragmenst (CTF) eredményez (94), ebben az esetben nem keletkezik A $\beta$ . Az APP<sub>s</sub>- $\alpha$  gátolja bizonyos szerin proteázok működését, valamint fokozza a sejt-sejt és sejt-szubsztrát adhéziót és neurotrofikus vagy neuroprotektív hatásokat mutat.



2. ábra Az APP szekretázokkal történő hasítása.

## II. 2. 4. Amiloid aggregátumok

Az APP-ből alternatív hasítással ( $\beta$ - , majd  $\gamma$ -szekretáz) képződő monomer  $A\beta$  peptidek termodinamikailag kedvezőtlen állapotban vannak. Az aminosavak hidrofób oldalláncait körülvevő vizes környezet miatt a monomerek rendkívül könnyen dimereket képeznek (95) vagy fibrillumokat, aggregátumokat alkotva más fehérjékhez kapcsolódnak (67, 68, 70-73). Az aggregáció legkisebb formájának a dimert találták (95), amely egyensúlyban van a protofibrillumokkal (96). Az aggregátumokban nem találtak nagyobb oligomereket (tetramereket, oktamereket), csak protofibrillumokat. A protofibrillumok néha gyöngyszerű láncokat alkotnak, ezeket a neurotoxikus (97), gömbölyű elemeket amiloid eredetű, diffúzibilis ligandumoknak („amyloid derived diffusible ligands”, ADDL) nevezték el (97). Az ADDL izolálható az agyból (98), plazmából és a cerebrospinális folyadékból és az AD betegek agyállományában 70-szer nagyobb mennyiségben található, mint az egészséges egyénében (99).

Kezdetben azt gondolták, hogy a fibrilláris  $A\beta$  felszaporodása indítja el a patológiai kaskád, amely AD-hoz vezet. Ma már azt is tudjuk, hogy kisebb  $A\beta$  oligomerek, ú.n. diffúzibilis ligandumok is toxikusak (100), de egy egészen új közleményben az aggregálódott  $A\beta(1-42)$  dodekamer formáját tartják a kognitív funkciók elvesztéséért felelősnek (101). Azt is bizonyították, hogy az intracellulárisan felszaporodott  $A\beta$

neurotoxikus (102) és tovább bonyolítja a helyzetet, hogy alternatív aggregációval stabil, vízoldható globuláris A $\beta$ (1-42) oligomer létezését is igazolták AD betegek agyában (103). Jelenlegi ismereteink szerint a fibrilláris A $\beta$  szerepe nem kizárólagos a neurotoxikus folyamatokban annak ellenére, hogy toxikus és számos hibás biofizikai és biokémiai folyamatot indukál, amelyek az idegsejtek hibás működéséhez, végül az idegsejtek pusztulásához vezetnek.

Az aggregációban kulcsfontosságúnak tartják az A $\beta$ (16-21) szekvenciát (KLVFFA) (104, 105). Az ún. béta-szerkezet rombolók ( $\beta$ -sheet breaker, BSB) vagy amiloid aggregációs inhibitorok (AAI) (106) az A $\beta$ (1-42) molekulának ehhez a szekvenciájához kötődnek. Először Tjernberg publikálta, hogy a KLVFFA fragmens gátolja az A $\beta$ (1-42) aggregációját (107). Soto kicserélte a Val-t az LVFFA szekvenciában Pro-ra és ezzel a módosítással nagyobb hatással gátolta az aggregációt (108), (109).

## **II. 2. 5. Az AD kialakulásával és patomechanizmusával kapcsolatos elképzelések**

### ***II. 2. 5. 1. Az amiloid kaszkád hipotézis***

Normál körülmények között az agyban az A $\beta$ -t az inzulin-bontó enzim, neprilizin és endotelin-konvertáló enzim lebontja (110). Nagyon fontos felfedezés, hogy az A $\beta$ -t a low-density lipoprotein (LDL) receptorral rokon fehérje által közvetített efflux is kiüríti az agyból (111).

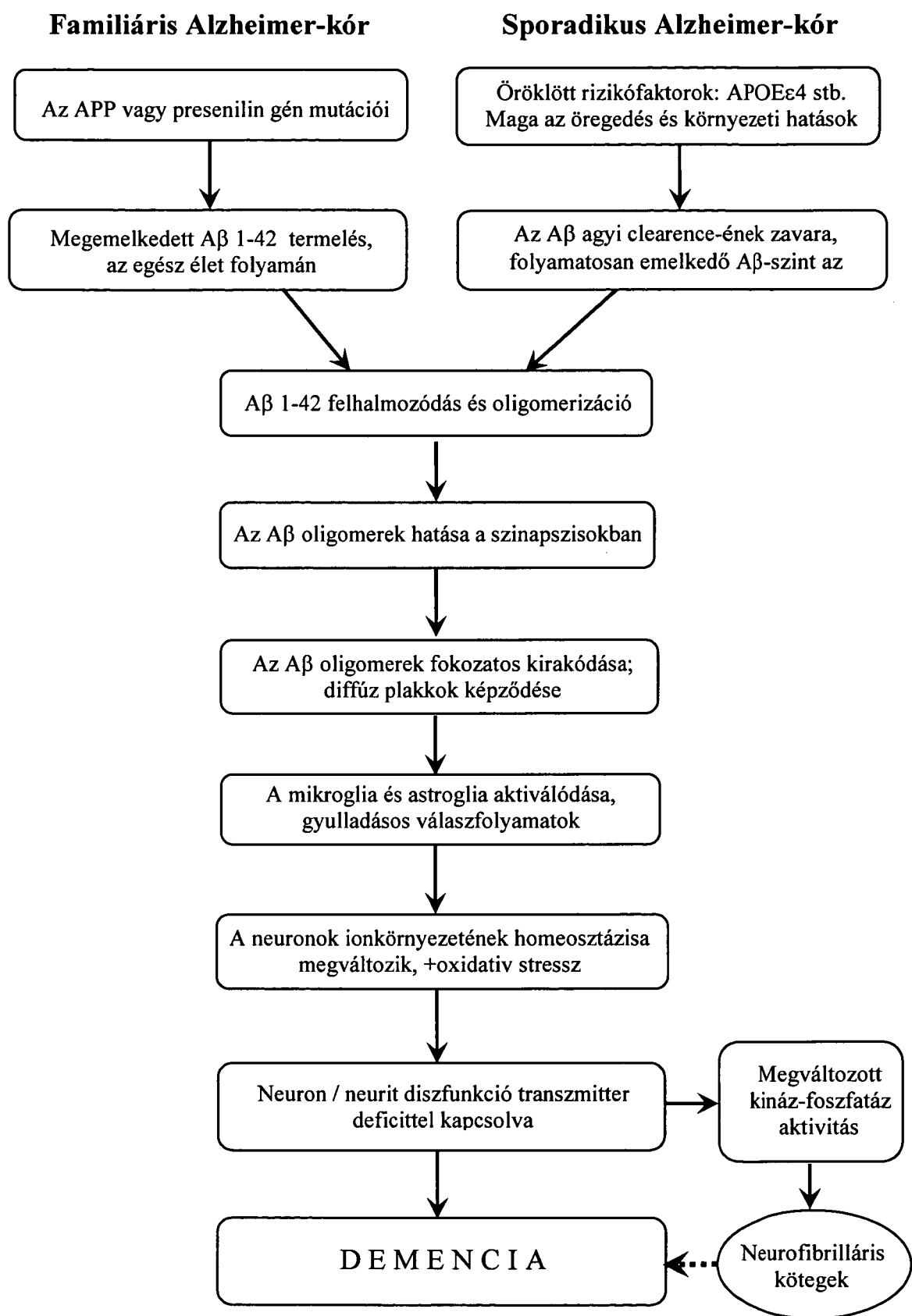
A széles körben elfogadott amiloid kaszkád hipotézis (112) szerint a betegség kialakulásában döntő fontosságú az A $\beta$  peptidek akkumulációja az agyban, amely AD-hoz vezet (113, 114). A hipotézis szerint a demenciához vezető neurodegeneráció első lépése az A $\beta$  termelődés és kiürülés egyensúlyának a megbomlása az agyban (113). Az A $\beta$  kulcsfontosságú szerepet játszik az AD betegek agyában található patológiás elváltozásokban, mint pl. a szinapszis vesztésben, gyulladásos folyamatok aktiválásában, neurofibrilláris változásokban, amelyek az idegsejtek pusztulásához vezetnek (**3. ábra**). A hipotézist számos vizsgálat eredménye támogatja, mint pl. a familiáris AD (FAD) esetén mutációk találhatók mind az APP, mind a presenilin génben és ezek a mutációk fokozzák az A $\beta$  keletkezését (115). Továbbá Down szindrómások agyában, akik extra APP génnel rendelkeznek, már korai életszakaszban megtalálhatók az amiloid plakkok (116, 117). Több

irodalmi adat is bizonyítja, hogy az A $\beta$  aggregátumok neurotoxikusak és ú.n. aggregációs inhibitorok ezt gyengítik (109, 118). Az A $\beta$  aktiválja az immunrendszert (119) és a mikrogliát is (120).

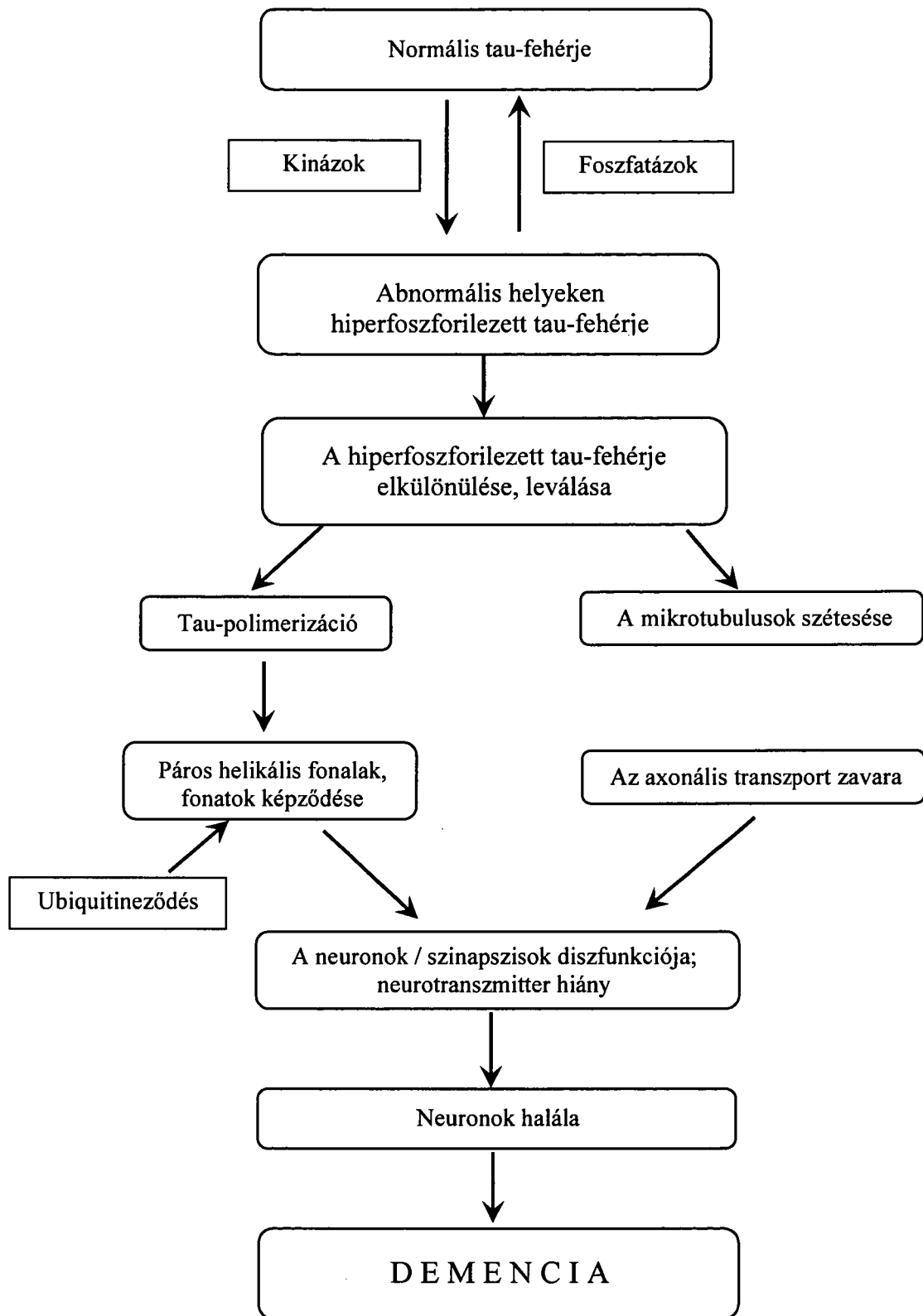
Néhány megfigyelés viszont nem magyarázható ezzel a hipotézissel, mint pl. az, hogy több mint 20 neurofibrilláris degenerációval járó demenciás betegség létezik amiloid plakkok nélkül (121), valamint az időskori, ú.n. sporadikus AD esetén az amiloid plakkok nincsenek korellációban a kognitív funkciók csökkenésével (122, 123). Azonban eddig nem ismert más elképzelés, amely kísérleti eredményekkel alátámasztva megmagyarázná az AD okát és kialakulását.

### ***II. 2. 5. 2. Tau hipotézis***

Az amiloid plakkokban található neurofibrilláris kötegek jellemzőek, de nem specifikusak az AD-re. A korai kutatások kimutatták, hogy a fonatok akkumulációja kapcsolatban van a klinikai tünetekkel (124). A tau patológiát a lassú neurodegeneráció általános útjának tekintették és a molekuláris mechanizmus vizsgálatok a fonatok megjelenéséhez vezető utak megértésével foglalkoztak. Amint korábban már említettem, az AD betegek agyában található neurofibrilláris kötegeket oldhatatlan páros helikális filamentumok alkotják, amelyek abnormálisan foszforilált tau fehérjéből állnak. A tau fehérje funkciója a mikrotubulusok stabilizálása (125), de a foszforiláció megváltoztatja a tau mikrotubulusokhoz való kötődési képességét és ez elindítja az aggregációt, innen kezdve a folyamat megállíthatatlan. Az évek során sikerült néhány, a hiperfoszforilációért felelős kinázt azonosítani, amelyek túlműködésével párhuzamosan a specifikus foszfatázok aktivitása csökken. A foszforiláció és defoszforiláció egyensúlyának megbomlása a legfontosab lépés a tau patomechanizmusában (4. ábra).



3. ábra Az amiloid-kaszád hipotézis.



**4. ábra** Az AD tau hipotézise.

### ***II. 2. 5. 3. Neurovaszkuláris hipotézis***

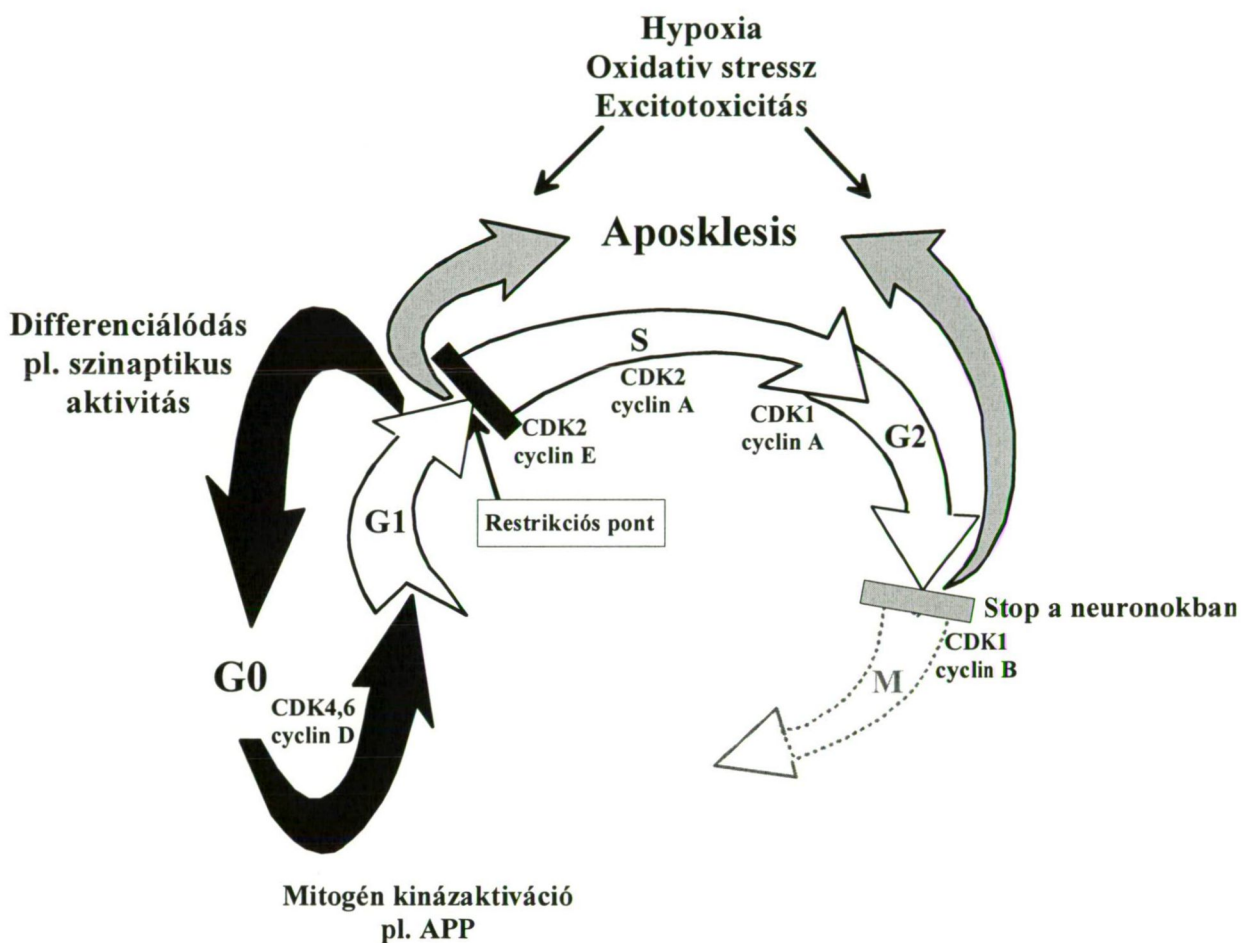
Az AD betegek kb. 1/3-ának cerebrovaszkuláris betegsége is van, amely magába foglalja a kis erek megbetegedését is (126). Számos megfigyelés mutatta, hogy a cerebrovaszkuláris rendszer működésében mutatkozó zavarok a kognitív funkciók csökkenésével és neurodegenerációval járnak. Az A $\beta$  károsíthatja mind az artériás ereket, mind az agyi kapillárisokat és a perifériás vaszkuláris betegségekkel együtt, mint pl. a hosszú ideje fennálló magas vérnyomás, szív-koszorúér vagy közös nyaki verőér megbetegedések és diabétesz módosíthatják a cerebrális keringést idős korban és ezek mind hozzájárulhatnak az AD kialakulásához (127). Feltételezik az agyban megemelkedett A $\beta$  szint és neurovaszkuláris működési zavarok közötti kapcsolatot (128). A fentiek alapján néhány kutatócsoport a sporadikus (nem genetikai eredetű) AD-t is neurovaszkuláris betegségnek tekinti (129). Kétségtelen, hogy összefüggés van a vaszkuláris és az AD demenciák között, de eddig még nem sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy az AD a vaszkuláris demenciák egyik formája (130). A vaszkuláris rizikófaktoroknak szerepe lehet az AD kezdeti kialakulásában, de nem részei az alapvető patomechanizmusnak (131).

### ***II. 2. 5. 4. Sejtciklus hipotézis***

Az AD patomechanizmusával kapcsolatos legújabb és legtöbbet vitatott elmélet szerint az öregedő idegsejtekben az amiloid plakkok és neurofibrilláris kötegek képződése sejt osztódás-szerű folyamatok újra aktiválódásával kapcsolatosak (132). Az elmélet megmagyarázza az agy kifejlődése és az AD közötti párhuzamot. Az AD betegeknél fellépő kognitív és más funkcionális változások a fordított fejlődési menetnek felelnek meg (133). Számos bizonyíték utal arra, hogy az AD patomechanizmusában a rendellenes szinaptikus plaszticitásnak, az idegsejtek differenciálódásának és a sejtciklus újra aktiválódásának van szerepe (134), bár a sejtek újra aktiválódása nem vezet szükségszerűen sejthalálhoz vagy patológias folyamatokhoz, ugyanis a sejtciklus aktiválódására utaló markereket találtak egészséges, AD-ra utaló jel nélküli idős egyéneknél is (135). Egészséges idős emberekben mitogén stimuláció (hipoxia, szinapszisok elvesztése, APP, homocisztein) hatására az idegsejt ciklus újra aktiválódását a sejtciklust kontrolláló mechanizmus aktiválódása követi, amely a sejtciklus korai fázisában (G1) megállítja a folyamatot (**5. ábra**) és újra differenciálódik az idegsejt. AD esetén a G1/S szabályozó mechanizmus hiányzik és a sejtek vagy aposzklézis (elhúzódó sejthalál) révén elpusztulnak vagy a sejtciklus késői fázisába



(G2) lépnek, amikor már nincs lehetőség a sejtek újra differenciálódására, emiatt a károsító hatások itt is aposzklézishez vezetnek (136).



**5. ábra** A neuronális sejtciklus aktiválódása és az aposzklézis megjelenése AD-ben.

## II. 2. 5. 5. Az ubiquitin-proteozom rendszer szerepe

Molekuláris szinten a genomban található információ nem megfelelő átalakítása, a DNS → RNS átírás hibái, zavara hibás fehérjék felszaporodását eredményezik. Az időskorral járó és több faktorú betegségek, különösen az ú.n. konformációs betegségek, mint pl. az AD, kialakulásában az APP mellett fontos szerepe lehet az ubiquitin-proteozom rendszernek is (137, 138).

## II. 2. 6. Az A $\beta$ kapcsolata fehérjékkel

Az A $\beta$  toxicitására több elképzelés is található az irodalomban. Az egyik hipotézis szerint oxidatív stressz indukálásával és a kalcium homeosztázis megváltoztatásával az A $\beta$  közvetlenül fejti ki a neurotoxikus hatását. A sérülésekre adott gyulladásos válaszok során aktiválja a komplement rendszert, a chemokineket, citokineket (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), a makrofág gyulladásos fehérjét (MIP-1 $\alpha$ ) felfokozott működésre készíteti és a ciklooxygenáz-2 (COX2) szintje, valamint a  $\beta$ 2-integrinek közé tartozó LFA-1 expressziója is növekszik AD betegek agyában (139). Ezeket az eseményeket az A $\beta$  aggregátumok közvetlenül mediálják a sejtmembránnal való kölcsönhatásuk és/vagy mikrogliahoz való kötődés révén. Az A $\beta$ (1-42) képes néhány, az idegsejteken található receptorhoz kötődni (inzulin receptor, serpin komplex receptor,  $\alpha$ -7 nikotin- és acetilkolin receptor, integrin  $\beta$ 1, N-metil-D-aszpartát receptor (NMDA), P75 neurotrofin receptor, stb.) és internalizálás után számos enzimhez is kötődhet (140) [5]. Még mindig vitatott, hogy a fehérjék monomer, oligomer vagy fibrilláris szerkezetű A $\beta$  peptideket kötnek meg.

## II. 2. 7. Az AD terápiás lehetőségei

Az AD betegeknél jelenleg alkalmazott gyógyszerek csak a tüneteket enyhítik, magát a betegséget még nem tudjuk gyógyítani. Az AD-ban tapasztalható neurotranszmitter zavar kezdetben olyan gyógyszerek kifejlesztését eredményezte, amelyek csak a tünetek kezelésére alkalmasak. Annak ellenére, hogy ezek egyike sem gyógyítja meg a betegséget, a tünetek enyhítésére számos országban bevezették őket. A betegség molekuláris patogenezisével kapcsolatos újabb kutatások olyan új, potenciális gyógyszerekhez vezettek, amelyek betegséget módosító hatással rendelkeznek és a klinikai tesztelésük folyamatban van.

### A tüneteket enyhítő gyógyszerek

#### *Acetilkolin-észteráz inhibitorok*

A kolinerg hipotézis szerint a kolinerg neuronok degenerációja zavart okoz a hippocampusban és az agykéregben, amelyek a memória és más kognitív funkciók zavarát okozzák (141). Egyik terápiás megközelítés a kolinerg neurotranszmissziót fokozza az

acetilkolint bontó enzim, az acetilkolinészteráz gátlásával. Ilyen gyógyszerek a *Donezepil* és *Galantamin*, amelyek szelektív acetilkolinészteráz inhibitorok, valamint a *Rivastigmin*, amely mind az acetilkolinészteráz, mind a butirilkolinészteráz működését gátolja (142). Ezek a gyógyszerek kb. 1-2 évig hatásosak, de csak enyhe vagy közepes stádiumú AD esetén (143).

#### *NMDA receptor blokkolók*

A glutamát a legfontosabb serkentő (excitátoros) neurotranszmitter az agyban. Normál körülmények között a glutamát és az NMDA receptoroknak fontos szerepük van a tanulásban és a memória folyamatokban. AD esetén a megemelkedett glutamát aktivitás az NMDA receptorok hosszantartó alacsony szintű aktiválását eredményezi. A *Memantin* egy nem-kompetitív NMDA-receptor antagonist, amely a poszt-szinaptikus NMDA receptorokhoz kötődve megvédi a neuronokat a megemelkedett glutamát hatásától (144), acetilkolin-észteráz inhibitorral kombinálva a hatása megnövekszik (145).

#### *Viselkedési problémák kezelése*

AD betegeknél igen gyakori az agresszió, pszichomotoros izgalom és pszichózis, különösen a betegség késői szakaszában. *Risperidon* és *Olanzapin* csökkentik az agresszió, izgalom és pszichózis mértékét (146), de az acetilkolin-észteráz inhibitorok is javítják a viselkedési tüneteket (141).

### **A betegséget módosító hatással rendelkező potenciális gyógyszerek**

Ezeknek a gyógyszereknek a kifejlesztésénél elsősorban az agyban az A $\beta$  termelődés és aggregáció gátlása és az A $\beta$  agyból történő kiürülésének fokozása volt a fő szempont.

#### *Szekretáz modulátorok*

Béta-szekretáz inhibitorokat fejlesztettek ki, hogy az A $\beta$  koncentrációját csökkentsék az agyban (147) és olyan  $\gamma$ -szekretáz inhibitorokat is előállítottak, amelyek más szubsztátokat nem bontanak (148). Az  $\alpha$ -szekretázt stimuláló szerek az APP hasítást a nem amiloid útra terelik és ezáltal csökkentik az A $\beta$  termelődését (149).

#### *A $\beta$ immunterápia*

Az első, A $\beta$  immunterápiával kapcsolatos közleményben kimutatták, hogy aktív immunizálás fibrilláris A $\beta$ -val AD transzgenikus egerekben nemcsak új plakkok képződését akadályozta meg, hanem csökkentette a már meglévő A $\beta$  lerakódásokat is (150). Hasonló eredményre vezetett A $\beta$  antigénnel történő passzív immunizálás is (151). A II. klinikai fázisban lévő, előre aggregáltatott A $\beta$ (1-42)-vel készült vakcinával történő aktív

immunizálási kísérleteket abba kellett hagyni, mert a vizsgálatban résztvevők 6%-ánál meningo-encephalitist okozott (152).

#### *A $\beta$ fibrillizációs inhibitorok*

Az AD kialakulásában döntő fontosságú az A $\beta$  konformáció változása az oldható  $\alpha$ -hélixes szerkezetből a könnyen aggregálódó  $\beta$ -redőzött struktúrába. Ezért az  $\alpha$ -hélixes szerkezet stabilizálása vagy a  $\beta$ -szerkezet rombolása ígéretesnek bizonyult új gyógyszerek tervezésénél. Ezek a vegyületek béta-szerkezet rombolók ( $\beta$ -sheet breaker, BSB) vagy amiloid aggregációs inhibitorok (AAI) (106). Peptid és nem-peptid BSB vegyületek ismertek. A nem peptidek általában sík alkatú molekulák, természetben előforduló biomolekulák pl. a melatonin (153), nikotin (154), kurkumin (155), de mesterségesen előállított vegyületek is rendelkeznek BSB hatással, mint pl. különböző benzofurán származékok (156) vagy a rifampicin antibiotikum (157).

Kis peptidek, amelyek gátolják az A $\beta$ -A $\beta$  vagy A $\beta$ -ApoE kölcsönhatásokat, megakadályozzák az A $\beta$  konformáció változását  $\beta$ -redőzött szerkezetre és az ezt követő fibrillizációt (118, 158). Glükózaminoglikánok is kötődnek az A $\beta$ -hoz és ezáltal megakadályozzák az aggregációt (159).

A réz és cink ionok az A $\beta$  aggregációját indukálva toxikus hatásúak. A fém kelátor *Clioquinol* (BPT-1) csökkenti az agyban az A $\beta$  lerakódást (160).

#### *Tau ellenes szerek*

Mivel a tau foszforilálást többféle kináz és foszfatáz közötti egyensúly szabályozza (161), egyetlen kináz gátlása valószínű nem elegendő a tau foszforilálás normalizálására.

#### **A betegség lefolyása alapján kiválasztott gyógyszerjelölt vegyületek**

Megfigyeléseken alapuló tanulmányok különböző típusú gyógyszerek és gyógyhatású készítmények védő hatásáról számoltak be, de ezeknek a kontrollált klinikai vizsgálata nem bizonyította egyértelműen az eredményességüket. Ilyenek pl. nem szteroid gyulladáscsökkentő szerek (162), koleszterin csökkentők, ösztrogének (163), antioxidánsok (164), E-vitamin (165), stb.

Ismeretes, hogy a koleszterin szerepet játszik az AD patogenezisében (166, 167). A koleszterin intracelluláris szintjét csökkentő gyógyszerek (pl. sztatinok) csökkentik az A $\beta$  szintjét mind *in vitro* (168), mind *in vivo* kísérletekben (169). Ezen eredmények alapján feltételezték, hogy a magas koleszterin szint is felelős lehet az AD kialakulásáért (170), tehát a koleszterin szint csökkentése a sejtekben terápiás célpont lehet. A legújabb

eredmények viszont azt mutatták, hogy a koleszterin szint csökkentése a neuronokban az A $\beta$  termelődést fokozza (171).

Mivel az állatmodellek nem tökéletesen relevánsak, az AD gyógyítására vagy legalább a betegség progressziójának megállítására alkalmas szerek felfedezésének hosszú és költséges útjának végén csak a klinikai kipróbálás döntheti el az adott vegyület hatásosságát embereken.

### III CÉLKITŰZÉSEK

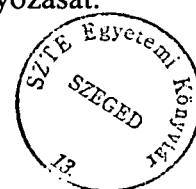
Mivel a GH-RH antagonistáknak fontos szerepe lehet az IGF-I- és IGF-II-függő daganatos betegségek gyógyításában és az irodalomban korábban leírt GH-RH antagonista csak nagy dózisban fejt ki a hatását, célul tűztük ki:

- 1) olyan új GH-RH antagonisták tervezését és előállítását, amelyek az irodalomban korábban leírt GH-RH antagonistáknál aktívabbak mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatokban,
- 2) az előállított új GH-RH antagonisták szerkezet-hatás összefüggéseinek megállapítását, hogy még aktívabb származékokat tervezzünk és állítsunk elő,
- 3) annak a hipotézisnek kísérletekkel való igazolását, hogy IGF-I- és IGF-II-függő tumorok növekedése GH-RH antagonistákkal gátolható,
- 4) a leghatásosabb antagonistákkal olyan onkológiai vizsgálatok elvégzését, amelyek elősegítik azok esetleges későbbi klinikai alkalmazását és
- 5) a GH-RH antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálatához a GH-RH receptor antigének előállítását, majd immunizálás után antitestek nyerését.

Az AD-vel kapcsolatos kutatásaink fontosságára utal, hogy még ma sincs hatásos gyógyszere. A mai elfogadott nézet szerint az Alzheimer-kór kialakulásában döntő szerepet játszik egy különleges membránfehérje, az amiloid prekursor protein, amelyből enzimes hasítással képződő A $\beta$  peptidek neurotoxikus hatása ma már bizonyított.

Célul tűztük ki:

- 1) az A $\beta$ (1-42) racionális szintézisének kidolgozását, mivel biológiai vizsgálatok céljára nagy mennyiségű és kellő tisztaságú A $\beta$ (1-42)-re volt szükségünk,
- 2) fluoreszcens jelölt A $\beta$  peptidek szilárd hordozón és klasszikus oldat fázisú módszerrel történő előállítását biológiai vizsgálatok céljára,
- 3) az A $\beta$ (1-42) aggregációs viszonyainak, valamint a neurotoxicitás és aggregáció közötti összefüggés tanulmányozását,
- 4) olyan neuroprotektív peptidek tervezését, előállítását és vizsgálatát, amelyek kivédik az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatásait,
- 5) potenciális gyógyszer kifejlesztéséhez vezér vegyület („lead”) előállítását,
- 6) az A $\beta$  és a neuroprotektív peptidek hatásmechanizmusának tanulmányozását.



## IV ANYAG ÉS MÓDSZEREK

[A szögletes zárójelben található vastag számok a témában megjelent és mellékelt közlemények sorszámaát jelzik.]

### IV. 1. PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA

#### IV. 1. 1. GH-RH antagonisták és antigének előállítása

A GH-RH antagonisták szilárd fázisú peptidszintézis módszerrel, manuális készülék és Boc-kémia alkalmazásával készültek, a részletes leírások a publikációkban találhatók [1], [6]. Röviden: a C-terminálison savamid csoportot tartalmazó származékok előállítására *para*-metil-benzhidrilamin (MBHA) gyantát (0.4-0.6 mmol/g, Bachem) alkalmaztunk. Az agmatin (1-amino-4-guanidino-bután) (Agm) C-terminálisú peptidek szintéziséhez a Boc-Agm-t szulfofenoxi-ecetsavon keresztül kapcsoltuk az MBHA gyantához (23). Az aminosavak  $\alpha$ -amino csoportja *terc*.butiloxikarbonil-védőcsoporttal (Boc) volt védve, a z oldallánc funkciós csoportok védelme a következő volt: az Arg tozil (Tos), az Aps és Glu ciklohexil észter (OcHex), a His(Bom), a homoarginin (Har) nitro (NO<sub>2</sub>), a Lys 2-klór-benziloxikarbonil (2-Cl-Z), a Ser és Thr benziléter (Bzl), a Tyr 2,6-diklór-benziloxikarbonil, a Cys *para*-metilbenzil, a *para*-amidino-fenilalanin (Amp) reaktív oldallánca alliloxikarbonil (Alloc) védőcsoporttal volt ellátva. Az Asn és Gln oldallánca nem volt védve. A kapcsolások során 3 ekvivalens feleslegben alkalmaztuk a védett aminosavakat és *N,N'*-diizopropil-karbodiimid kapcsoló reagenssel, ill. egyes nehezen kapcsoló aminosavak estén benzotriazolil-oxi-trisz(dimetilamino)foszfónium-hexafluorofoszfáttal (BOP) vagy O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónium-hexafluoro-foszfáttal (HATU) diklór-metánban (DCM), dimetilformamidban (DMF), vagy elegyükben oldva kapcsoltuk az aminosavakat. A Boc-Asn-t és Boc-Gln-t előre elkészített 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) észterükkel kapcsoltuk. Egy-két óra kapcsolási idő után Kaiser teszttel (172) ellenőriztük a kapcsolási reakció lezajlását. Pozitív teszt esetén a kapcsolást vagy megismételtük, vagy



acetilezéssel kizártuk a szabad aminocsoportokat a további kapcsolási reakciókból. A következő aminosav kapcsolása előtt a Boc-védőcsoportot TFA:DCM (1:1) eleggyel eltávolítottuk és diizopropil-etilaminnal (DIPEA) (5% DCM-ben) semlegesítettük. A kész peptidet a gyantán acileztük ecetsavval, halogénezett karbonsavakkal, egy- és kéttagú aromás gyűrűt tartalmazó savakkal, elágazó és nem elágazó láncú, különböző lánchosszúságú zsírsavakkal és dikarbonsavakkal.

A ciklikus peptidek előállítása során a laktám hidat a gyantán DIC kapcsolással építettük ki a Boc-Glu(OFm)-OH vagy Boc-Asp(OFm)-OH és Boc-Lys(Fmoc)-OH vagy Boc-Orn(Fmoc)-OH oldalláncában az Fm-észter ill. Fmoc-védőcsoportok piperidinnel történő (20% DMF-ben) eltávolítása után.

Az Amp tartalmú peptideknél a HF-os hasítást megelőzően tetrakis-(trifenilfoszfin)palládium reagenssel (3 ekvivalens), kloroform/ecetsav/*N*-metil-morfolin (37:2:1) oldószer elegyben nitrogén atmoszférában 2 óra alatt távolítottuk el az oldalláncról az Alloc védőcsoportot (173).

Az antigén peptidek előállítása is szilárd fázisú peptidszintézis módszerrel, manuális készülék és Boc-protokol alkalmazásával történt MBHA gyantán.

#### **IV. 1. 2. GH-RH-R és SV antiszérumok előállítása**

Az előállított 3 receptor peptid szekvencia egy részét glutáraldehiddel BSA-hoz, a másik felét pedig a gyári előírás szerint maleinimid által aktivált KLH fehérjéhez (Pierce) kapcsoltuk. Fehér, nőstény Új-Zélandi nyulakat immunizáltunk [7] a haptén-BSA és haptén-KLH konjugátumokkal. Az első injekció beadása után 2 héttel a kezelést megismételtük, majd 4 hónapig, havonta egyszer injektáltuk az állatokat. A kezelés befejezése után a szérumokat összegyűjtöttük, tisztítottuk [7], majd a felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

#### **IV. 1. 3. A $\beta$ peptidek előállítása**

A tiszta A $\beta$ (1-42) előállítása nem problémamentes, ezért kidolgoztuk a racionális szintézisét [8]. Az A $\beta$ (1-42)-t és fragmenseit manuális szilárd fázisú peptidszintézis módszerrel és Fmoc-stratégiával Wang gyantán (0.41 mmol/g) állítottuk elő. Az A $\beta$ (1-42)

és fragmensei a C-terminálison szabad karboxilcsoportot tartalmaztak, a részletes leírás a [8] publikációkban található. Az Fmoc-protokollnak megfelelően az aminosavak  $\alpha$ -amino csoportja 9-fluorenil-metoxikarbonil védőcsoporttal (Fmoc) volt védve. Az oldallánc funkciós csoportok védelme a következő volt: az Arg  $N^G$ -2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf), az Asp, Glu, Ser, Thr és Tyr *terc*.butil, a His  $N^{im}$ -tritol (Trt), a Lys pedig Boc védőcsoporttal volt ellátva, az Asn és Gln oldallánca nem volt védve. Közvetlenül a kapcsolások előtt a 3 ekvivalens feleslegben alkalmazott védett aminosavakat 1-2 ml DMF-ben oldottuk és ezt 10% anizolt tartalmazó 10 ml DCM-nal hígítottuk. *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (DCC) és HOBt kapcsoló reagenssel, ill. egyes nehezen kapcsoló aminosavak esetén BOP vagy HATU reagenssel ugyancsak 10% anizolt tartalmazó oldószer elegyben kapcsoltuk az aminosavakat. Két óra kapcsolási idő után Kaiser teszttel (172) ellenőriztük a kapcsolási reakció lejárásdát. Pozitív teszt esetén a kapcsolást vagy megismételtük BOP vagy HATU reagenssel, vagy ecetsav anhidriddel (30 v/v%) DCM/anizol (9:1) elegyben történő acetilezéssel kizártuk a szabad aminocsoportokat a további kapcsolási reakciókból. A következő aminosav kapcsolása előtt az Fmoc-védőcsoportot 20% piperidint és 10% anizolt tartalmazó DMF eleggyel eltávolítottuk. A védőcsoport eltávolítást követően DMF, MeOH és DCM oldószerekkel mostuk a gyantát, az utolsó mosásnál 10% anizolt tartalmazó DCM elegyet alkalmaztunk.

Az A $\beta$  peptid rövid fragmensei és ezek származékai szilárd fázisú peptidszintézis módszerrel, manuális készülék és Boc-protokoll alkalmazásával készültek MBHA gyantán, a részletes leírások a publikációkban találhatók [9, 10]. A Boc-protokollnak megfelelően az aminosavak  $\alpha$ -amino csoportja *terc*.butiloxikarbonil-védőcsoporttal (Boc) volt védve, az oldallánc funkciós csoportok védelme a Boc-stratégiának megfelelő volt, az Asn és Gln oldallánca nem volt védve. A kapcsolások során 3 ekvivalens feleslegben alkalmaztuk a védett aminosavakat és DCC/HOBt kapcsoló reagenssel DCM-ban, DMF-ben, vagy elegyünkben oldva végeztük el a kapcsolást. Két óra kapcsolási idő után Kaiser teszttel (172) ellenőriztük a kapcsolási reakció lejárásdát. Pozitív teszt esetén a kapcsolást vagy megismételtük, vagy ecetsav anhidriddel (30 v/v%) DCM-ban acetileztük a szabad aminocsoportokat. A láncban soronkövetkező aminosav kapcsolása előtt a Boc-védőcsoportot TFA:DCM (1:1) eleggyel eltávolítottuk és trietilaminnal (10% DCM-ban) semlegesítettünk. A kész peptidet vagy acetileztük a gyantán, vagy megfelelő spaceren keresztül jelölő csoporttal láttuk el, vagy szabad N-terminálisú peptidek esetén lehasítottuk a Wang gyantáról.

#### IV. 1. 4. Fluoreszcens jelölt peptidek előállítása

A még hordozón lévő, oldallánc védőcsoportokat tartalmazó A $\beta$ (1-42) (0.035 mM) fluoreszcens jelöléséhez 6 equivalent 7-amino-4-metil-3-kumarinil-ecetsavat (AMCA) 6 equivalent HATU reagenssel DMF oldatban 12 equivalent DIPEA jelenlétében 20 órán át kapcsoltunk. Ehhez hasonló módon, hordozón készült az AMCA-A $\beta$ (25-35) jelölt peptid is. A Met-tartalmú peptidek hordozóról történő hasítására több módszert is kipróbáltunk, a következő koktél alkalmazásával 3 óra hasítással kaptuk a legtisztább nyers terméket: 81% TFA, 5% fenol, 5% tioanizol, 3% H<sub>2</sub>O, 2.5% DTT, 2% DMS és 1.5% NH<sub>4</sub>I [11]. A nyers peptidet jéghideg dietiléterrel kicsaptuk, mostuk dietiléterrel és metanollal, majd szárítottuk. A nyers terméket hexafluoro-izopropanolban (HFIP) oldottuk, deszt. vízzel hígítottuk és RP-HPLC-vel Phenomenex Jupiter C<sub>4</sub> oszlopon (10  $\mu$ m) a fent leírt oldószer elegyek felhasználásával, gradiens elúciót alkalmazva (30-90% B) tisztítottuk. A tiszta, fluoreszcens csoporttal jelzett peptidek analízise és azonosítása a fent ismertetett módon történt.

A hordozón lévő, oldallánc védőcsoportokat tartalmazó A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) és az LPFFD fluoreszcens jelölését 5(6)-karboxifluoresceinnel (FAM) is elvégeztük. A jelölt peptidek gyantáról történő hasítása, tisztítása, analízise és azonosítása a fent ismertetett módon történt. Az N <sup>$\alpha$</sup> -5(6)-FAM-LPFFD-NH<sub>2</sub>-ot 90% TFA, 5% H<sub>2</sub>O, 5% fenol eleggyel 4 óra alatt hasítottuk le a hordozóról, a tisztítás és azonosítás a fent leírtak szerint történt [11].

Oldatfázisban flureszcein-izotiocianáttal (FITC) DMSO oldatban, sötétben és N<sub>2</sub> atmoszféra alatt jelöltük az A $\beta$ (25-35), RIIGL-NH<sub>2</sub> és RVVIA-NH<sub>2</sub> származékokat. A peptideket 1.2 equivalent feleslegben alkalmazva sokkal tisztább nyers termékekhez jutottunk, mint FITC felesleg esetén. Az A $\beta$ (25-35)-ben a Lys<sup>28</sup> oldallánca Fmoc-védőcsoporttal volt ellátva, amelyet a FITC kapcsolása után 20% piperidin oldattal a szokásos módon távolítottunk el. Tisztítás után a FITC csoporttal jelzett peptidek analízise és azonosítása a fent ismertetett módon történt [11].

### IV. 2. PEPTIDEK HASÍTÁSA A HORDOZÓRÓL

#### IV. 2. 1. GH-RH antagonisták

Az MBHA gyantáról történő hasítás és az oldallánc védőcsoportok eltávolítása vízmentes hidrogenfluoriddal (HF) történt (10 ml hasító reagens/1 g gyanta) 0 °C-on 60-90

perc alatt. Gyökfogóként 10% m-krezolt alkalmaztunk a hasítás során, hogy elkerüljük a mellékreakciókat. A hasítási reakció után vákuum és nitrogén áram segítségével eltávolítottuk a HF-ot, majd dietil-éterrel kicsaptuk a szabad peptidet. Szűrés és dietil-éterrel való többszöri mosás után a peptidet 50%-os vizes ecetsavval oldottuk ki a gyanta mellől, desztillált vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk.

## **IV. 2. 2. A $\beta$ peptidek**

A Wang gyantáról történő hasítás és az oldallánc védőcsoportok eltávolítása A $\beta$ (1-42) és hosszabb fragmensei Fmoc-szintézise esetén TFA/DTT/H<sub>2</sub>O (90:5:5 v/v) eleggyel 20°C-on történt. Négy óra hasítási idő után a maradék műgyantát szűréssel eltávolítottuk és kétszer mostuk TFA-val. Az összegyűjtött TFA oldatokat 0.1% TFA-t tartalmazó acetonitril oldattal hígítottuk úgy, hogy az elegyben az acetonitril végső koncentrációja kb. 30% legyen.

A rövid peptidek hordozóról történő hasítása és az oldallánc védőcsoportok eltávolítása vízmentes hidrogenfluoriddal (HF) történt (10 ml hasító reagens/1 g peptid-hordozó) 0 °C-on 45-60 perc alatt. Gyökfogóként 2% anizolt és 8% dimetilszulfidot alkalmaztunk. A hasítási reakció után a feldolgozás megegyezett a fent ismertetettel.

## **IV. 3. PEPTIDEK TISZTÍTÁSA**

### **IV. 3. 1. GH-RH antagonisták**

A GH-RH antagonistákat MacRabbit (Rainin, Woburn, MA, USA) HPLC rendszerrel tisztítottuk Vydac (Hesperia, CA, USA) oszlopon (228TP modell, 10x250 mm, C<sub>18</sub> szilikagél) gradiens elúcióval (30-70% B oldat 140 perc alatt). Eluens oldatként (A) 0.1%-os vizes TFA oldatot és (B) 0.1% TFA-t tartalmazó 70%-os vizes acetonitrilt alkalmaztunk és az eluenst 220 nm-en vizsgáltuk. A frakciókat analitikai HPLC-vel ellenőriztük és a 95%-nál tisztább frakciókat összegyűjtöttük és liofilizáltuk.

### **IV. 3. 2. A $\beta$ peptidek**

Az A $\beta$ (1-42) peptidet tartalmazó, acetonitrillel hígított TFA oldatot előzetes liofilizálás nélkül, azonnal tisztítottuk Simadzu SCL-8 preparatív HPLC rendszerrel (SHIMADZU Co. Kyoto, Japan) PrepPak<sup>R</sup> Cartridge (47x300 mm, Bakbond WP C<sub>4</sub>, 15 $\mu$ m,

Waters Division of Millipore, USA) oszlopon. Lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk 80 ml/perc áramlási sebességgel. Eluens oldatként (A) 0.1%-os vizes TFA oldatot és (B) 0.1% TFA-t tartalmazó 80%-os vizes acetonitrilt alkalmaztunk és az eluenst 220 nm-en vizsgáltuk. A frakciókat analitikai HPLC-vel ellenőriztük és a 95%-nál tisztább frakciókat összegyűjtöttük és liofilizáltuk.

A rövidebb peptidek tisztítása szemipreparatív HPLC-vel történt (Knauer type No. 50, Berlin, Németország) C<sub>18</sub> Phenomenex Jupiter szilikagél oszlopon (250x21.2 mm, 300 Å, 10 µm). Az eluens oldatok a fentiekkel megegyeztek, az áramlási sebesség 4.5 ml/perc volt.

#### **IV. 4. PEPTIDEK ANALÍZISE ÉS AZONOSÍTÁSA**

A nyers és tisztított GH-RH antagonistákat analitikai RP-HPLC-vel (Hewlett-Packard, Waldbronn, Németország, modell 1090), W-porex C<sub>18</sub> fordított fázisú oszlopon (Phenomenex, Belmont CA, USA; 4.6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm), az Aβ peptideket Phenomenex (Jupiter) C<sub>4</sub> fordított fázisú oszlopon (4.6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) izokratikus és gradiens elúcióval ellenőriztük 220 és 280 nm-en.

Aminosav analízist 6M sósavval történő (110°C, 20 óra vákuumban) hidrolízis után Beckman 6300 aminosav analizátorral végeztük GH-RH antagonistáknál és Aβ peptideknél HP Amino Quant aminosav analizátorral (Hewlett-Packard, Waldbronn, Németország). A természetes aminosavak mért mennyisége megfelelt a várt értékeknek.

A tömegspektrumokat FinniganMat TSQ-7000 tömeg spektrométerrel (Finnigan-MAT, San Jose, CA, USA) ESI-MS módban vizsgáltuk, a mért értékek megegyeztek a számított értékekkel.

#### **IV. 5. PEPTIDTARTALOM MEGHATÁROZÁSA**

A biológiai mérésekhez felhasznált Aβ minták peptidtartalmát fotometriás méréssel bicinkoninsavas módszerrel (BCA) határoztuk meg (174). A BCA Assay Kit (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) leírását követve készítettük el az oldatokat és a kalibrációs görbe felvételéhez marhaszérum albumin (bovine serum albumin, BSA) oldatot használtunk. A

minták  $[\text{Cu}(\text{BCA})]^-$  komplex tartalmának abszorbanciáját 96-lyukú lemezen speciális spektrofotométerrel (plate reader) határoztuk meg 560 nm-nél.

## IV. 6. *IN VITRO* BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

### IV. 6. 1. GH-RH antagonisták vizsgálata

#### *IV. 6. 1. 1. Szuperfúziós vizsgálatok*

A GH-RH által indukált GH felszabadulás gátlása patkányból izolált hipofízis sejteken történt (175, 176). Először az antagonista peptidek oldatát ( $10^{-7} - 10^{-9}$  M) perfundáltuk a sejteken 9 percig, majd hGH-RH(1-29) $\text{NH}_2$  ( $10^{-9}$  M) és a GH-RH antagonista elegyével további 3 percig, ez adta 0 perces GH választ. Az antagonisták elhúzódo hatásának tanulmányozásához 30, 60, 90 és esetenként 120 perc után 3 percig ismételtén hGH-RH(1-29) $\text{NH}_2$ -dal ( $10^{-9}$  M) perfundáltuk a sejteket. A GH tartalmat az összegyűjtött 1 ml-es mintákban RIA-val határoztuk meg [12], az értékelés egy speciálisan erre a célra tervezett komputer programmal történt (177). A hGH-RH(1-29) $\text{NH}_2$ -dal történő stimulálásra kapott GH válaszokat az antagonista nélküli GH válaszok %-ban adtuk meg és ezeket az értékeket összehasonlítottuk a standard antagonistával ( $[\text{N-Ac-Tyr}^1, \text{D-Arg}^2,]\text{hGH-RH(1-29)-NH}_2$ ).

#### *IV. 6. 1. 2. Kötődési vizsgálatok*

Kompetitív kötődési vizsgálatokban azt tanulmányoztuk, hogy a GH-RH antagonisták ( $10^{-6} - 10^{-12}$  M) milyen mértékben szorították le patkány hipofízis sejt membrán homogenizátumról a  $^{125}\text{I}$ -dal jelzett  $[\text{His}^1, \text{Nle}^{27}]\text{hGH-RH(1-32)NH}_2$ -ot (178). A kötődési affinitást az antagonista - receptor komplex disszociációs állandójával, a  $K_i$  értékkel fejeztük ki. A számolásokat McPherson módszerével végeztük (179). A relatív affinitás értékeket a standard antagonistához ( $[\text{N-Ac-Tyr}^1, \text{D-Arg}^2,]\text{hGH-RH(1-29)-NH}_2$ ) történő viszonyítással kaptuk.

#### ***IV. 6. 1. 3. Proliferációs vizsgálatok***

MiaPaCa-2 humán pancreas ráksejteket 96-lyukú lemezen a GH-RH antagonisták  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$  és  $10^{-5}$  M koncentrációjú oldataival kezeltünk 70–72 órán át, majd az MTT tesztben [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid] képződött formazant 540 nm-nél speciális spektrofotométerrel (plate reader) (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) (180) mértük. Az eredményeket a kontroll %-ban adtuk meg.

#### ***IV. 6. 1. 4. IGF-I és IGF-II meghatározása***

Az IGF-I meghatározásához a mintákat extraháltuk (181) és a szérum szintek meghatározásához anti IGF-I antiszérumot (UB<sub>2-495</sub>) használtunk.

#### ***IV. 6. 1. 5. Reverz transzkripció PCR (RT-PCR) vizsgálatok, Southern-blot analízis, Northern-blot analízis***

Ezekkel a módszerekkel a GH-RH-R, IGF-I mRNA és GH meghatározásokat a szakirodalomban leírt módon végezték el a biológus partnerek.

### **IV. 6. 2. A $\beta$ peptidek vizsgálata**

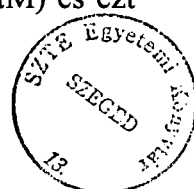
#### ***IV. 6. 2. 1. Neurotoxicitás és neuroprotektív hatás vizsgálata MTT tesztel***

Az A $\beta$ (1-42) és fragmensei neurotoxikus, valamint a rövid peptidek neuroprotektív hatásait SH-SY5Y differenciált humán neuroblasztoma sejteken mértük MTT tesztel. A sejteket 24 órán át kezeltük a vizsgált peptidek oldataival, majd a 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol-bromid (MTT) redukált formáját, a formazánt 3 órás, 37 °C-on történő kezelés után DMSO-EtOH (4:1) eleggyel extraháltuk a sejtekből és a szín intenzitását ELISA plate readerrel 550 nm-nél mértük (182).

#### ***IV. 6. 2. 2. Fluoreszcencia mérések***

##### ***IV. 6. 2. 2. 1. Astroglia sejtenyészet***

Patkány astroglia sejteket 12 lyukú sejtenyésztő edényben lévő üveglapocskákon 4-6 hétig tenyésztettünk, majd 7.5 órán át A $\beta$  peptidekkel (1  $\mu$ M) és ezt



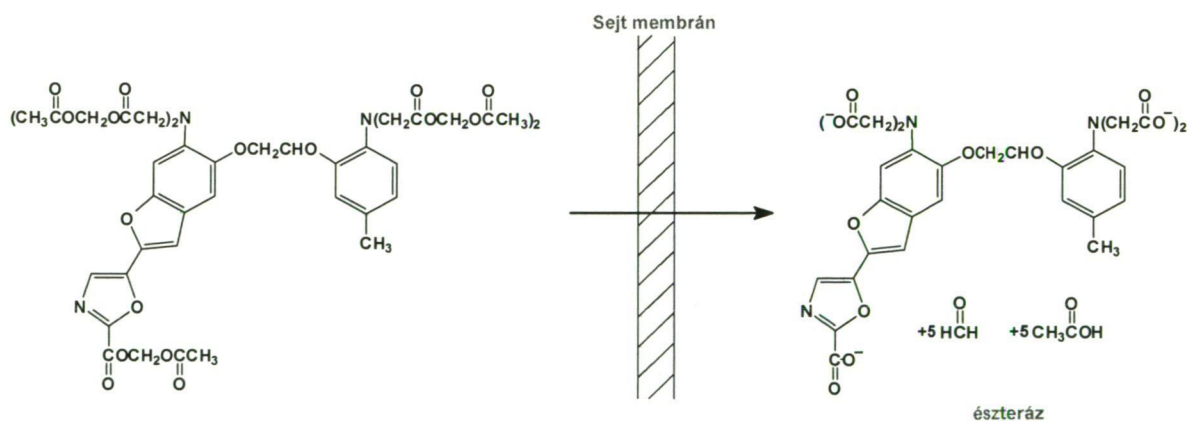


követően 30 percig 2  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM festékkel kezeltük 37 °C-on. A Fura-2 festék negatív töltését az acetometil-észter (AM) védőcsoport elfedi, így könnyen bejut a sejtekbe, ahol a sejten belüli észterázok hidrolizálják (6. ábra). A Fura-2 megköti a felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$ -t, amelyet „microfluorescence imaging” technikával mérni tudunk. A kezelt sejteket tartalmazó üveglemezeket mosás után kvarc küvettába helyeztük és Hitachi F-2000 spektrofluoriméterrel 340 és 380 nm-en történő gerjesztés után 495 nm emissziós hullámhossznál mértünk. A Fura-2 festékhez kötődött  $\text{Ca}^{2+}$ -t mérjük 340 nm-es gerjesztésnél és a szabad festéket 380 nm-nél. A kettő aránya a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás mértékét mutatja [9].

#### IV. 6. 2. 2. 2. Neuron sejtenyészetben

Humán striatumból származó, egy vektor bevitelével állandó osztódásra képes neuron sejtenyészetet (neuroblasztóma) az A $\beta$ (1-42) peptiddel és rövid analógjaival kezeltünk 10 percig. A transzmembán potenciálra érzékeny oxonol fluoreszcens festékkel (DiBAC<sub>4</sub>, 2 $\mu\text{M}$ ) 2 perc kezelés után vizsgáltuk a nyugalmi transzmembrán potenciált. A sejtek fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACStar<sup>PLUS</sup> flow-citométerrel határoztuk meg 488 nm-es gerjesztés és 540 nm-es emissziós hullámhosszknál. Minden mintában 10000 sejtet vizsgáltunk [13].

### Fura-2AM



**6. ábra** Fura-2-AM bejutása a sejtekbe és a festék felszabadulása sejten belüli hidrolízissel.

#### ***IV. 6. 2. 3. FT-IR mérések***

Az A $\beta$  peptidek a kísérleti körülményektől függően különböző konformációs és aggregációs állapotokban fordulhatnak elő, ezért az FT-IR vizsgálatok előtt standardizáltuk a körülményeket. Az A $\beta$ (1-42) és A $\beta$ (1-40) peptideket 10mg/ml DMSO- vagy HFIP-ben oldottuk és felhasználásig ezt az oldatot fagyasztva tároltuk. Ezekben a viszonylag nagy koncentrációjú oldatokban nem találtunk  $\beta$ -szerkezetre utaló jeleket [14]. Az oldatokat mérések előtt 1 mg/ml töménységre hígítottuk nehézvízzel készült fiziológiás sóoldattal, amelynek a pH-ját foszfátpufferrel 7.4-re állítottuk (PBSA) és azonnal elkezdtük az FT-IR spektrumok felvételét az amid-I régióban Nicolet Impact 410 spektrométerrel. A 2D FT-IR analízist 1600-1700 cm<sup>-1</sup>-nél házilag írt programmal végeztük [15].

#### ***IV. 6. 2. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok***

Az A $\beta$  peptidek aggregációját és a rövid peptideknek az előbbieik aggregációjára kifejtett hatását transzmissziós elektron mikroszkóppal (TEM) tanulmányoztuk. A peptidekből kétszer desztillált vízzel 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk 10 perc szonikálással. Ezeket a mintákat 1-6 napig 37 °C-on inkubáltuk, majd 10  $\mu$ l mennyiségeket szénnel borított réz-gridekre (Electron Microscopy Sciences, Washington DC, USA) vittünk fel, 0.5% (v/v) glutáraldehid oldattal fixáltuk, kétszer desztillált vízzel 3-szor mostuk és 2% (w/v) uranilacetáttal jelöltük. Az oldat feleslegét 2 perc múlva szűrőpapírral óvatosan leitattuk, a visszamaradó vékony filmréteg levegőn gyorsan megszáradt. Közben az uranilacetát behatolt a szabálytalan felszínű szerkezetekbe. Mivel a színező anyag egyenletesebben tudott eloszlani az aggregátumok környezetében, a sötét háttérből világos szerkezetekként tűntek elő az aggregátumok a TEM vizsgálatok során. A grideket Philips CM 10 transzmissziós elektron mikroszkóppal (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) 100 kV feszültségnél, Megaview II Soft Imaging System felhasználásával, 25000-, 46000- és 64000-szeres nagyítással vizsgáltuk [10].

#### ***IV. 6. 2. 5. Dinamikus fényszóródás mérés***

A dinamikus fényszóródás (DLS) méréseket 25 °C-on He-Ne lézerrel (633 nm) ellátott Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK) készülékkel, Non-Invasive Back Scatter (NIBS®) alkalmazásával végeztük, ami azt jelenti, hogy a szórt fényt 173° szögben detektáltuk. A translációs diffúziós koefficienszt a mérési

adatokból autokorelláció után a Dispersion Technology Software 4.0 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK) program a szabályozó CONTIN algoritmus felhasználásával számolta. A szóródó részecskéket kemény gömböknek feltételezve, a látszólagos hidrodinamikai sugarukat a diffúziós paramétereiből a Stokes-Einstein egyenlettel számolhatjuk ki:  $R_h = k_B T / (6\pi\eta D_T)$ , ahol  $k_B$  a Boltzman konstans,  $T$  az abszolút hőmérséklet  $\eta$  a médium viszkozitása és  $D_T$  a translációs diffúziós koefficiens. A mintákat a TEM vizsgálatoknál leírtak szerint készítettük elő, a vizes oldatokat az inkubáció előtt 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF steril membrán szűrőn szűrtük. A korellációs funkció és látszólagos hidrodinamikai sugarak ( $R_h$ ) eloszlását és a minták fölötti szórt intenzitásokat 2 napig vizsgáltuk [16].

#### ***IV. 6. 2. 6. Kongóvörös kötődési vizsgálatok***

A kongóvörös (CR) festék kötődési vizsgálatokhoz a peptidek előkészítése hasonló volt az MTT teszthez, de ebben az esetben a sejtenyésztéshez használt médium helyett pufferben (PBS, pH=7.4) oldottuk a vizsgálandó vegyületeket, majd 37 °C-on egy napig inkubáltuk a mintákat. Az aggregálódott peptid-CR szuszpenzió CR tartalmát 550 nm-nél fotometrikusan ELISA „plate reader”-rel mértük [10].

#### ***IV. 6. 2. 7. Stabilitás vizsgálatok***

Az A $\beta$ (25-35) stabilitását deszt. vízben és puffer oldatban fiziológiai ion koncentrációnál, semleges és bázisos pH értékeknél vizsgáltuk. Steril körülmények között különböző ideig 37 °C-on inkubáltuk az oldatokat, majd RP-HPLC-vel ellenőriztük a peptid bomlását. A bomlástermékeket ESI-MS-sel és a peptid fragmensek szintézisével igazoltuk [17].

#### ***IV. 6. 2. 8. Elektrofiziológiai mérések***

Fiatal patkányok (20-30 napos) lefejezése után a mozgatókéregből vibratómmal (Campden Instruments) 400  $\mu\text{m}$  szeleteket készítettünk, majd Haas mérőkamrába helyeztük és szobahőmérsékleten 1 órán át, 1ml/perc áramlási sebességgel inkubáltuk a méréshez használt oldattal. Az agyszeleteket bipoláris rozsdamentes acél mikroelektróddal (FHC,

USA) közvetített 0.033 Hz pulzusokkal stimuláltuk. Az elektród a felszín alatt kb. 350  $\mu\text{m}$  mélyen volt elhelyezve és az ingerlések intenzitása 20 és 70  $\mu\text{A}$  között változott [18].

## **IV. 7. *IN VIVO* BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK**

### **IV. 7. 1. GH-RH antagonisták *in vivo* vizsgálata**

#### ***IV. 7. 1. 1. GH felszabadulás gátlása***

A kísérleteket felnőtt hím Sprague-Dawley, illetve Wistar R-Amsterdam tenyészetből származó patkányokon végeztük 7 állattal csoportonként és általában 5 csoporttal dolgoztunk. Az állatok pentobarbitállal (6mg/100g testtömeg) intraperitoneálisan (i.p.) történő elaltatása után 30 perccel a juguláris vénából vérmintát vettünk (0 perces minta). Ezután egy állat csoport hGH-RH(1-29)-NH<sub>2</sub>-ot, a többi csoportok pedig vagy a standard antagonistát ([N-Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Arg<sup>2</sup>,]hGH-RH(1-29)-NH<sub>2</sub>) 100 és 400  $\mu\text{g/kg}$  dózisban, vagy pedig a vizsgált új GH-RH antagonistát 20 és 80  $\mu\text{g/kg}$  dózisban kapták 30 másodperccel a hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> (3  $\mu\text{g/kg}$  i.v.) beadása előtt. Az antagonista vegyülettel történő kezelések után a 5, 15, 30 és esetenként 60 perc elteltével a juguláris vénából levett vérmintákból RIA-val [12] határoztuk meg a GH szinteket. Az adatok értékelésére speciális formulát alkalmaztunk [19].

Esetenként normál és hGH-RH-t expresszáló transzgenikus egereken is elvégeztük az *in vivo* endokrin kísérleteket.

#### ***IV. 7. 1. 2. Krónikus kezelés GH-RH antagonistával***

A GH-RH antagonistát (20  $\mu\text{g}$ ) 0.1 ml 10% propilénglikolt tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk és naponta kétszer i.m. injektáltuk 28 napos, még növésben lévő nőnemű patkányokba, a kezelés 14 napig tartott. A kontroll csoport csak oldószer injekciókat kapott ugyancsak i.m. Az állatok tömegét és hosszát 4, 5 és 6 hetes korukban mértük. Az utolsó kezelés után kb. 18 óra elteltével a hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> (10  $\mu\text{g/kg}$  i.v.) által indukált GH válaszokat az altatásban lévő állatok juguláris vénáiból levett vérmintákból RIA-val [12] határoztuk meg [20].

#### **IV. 7. 1. 3. Onkológiai tesztek**

A különböző humán tumor sejtvonalakat immunhiányos hím egerekben (nude mice) kb. 8 hétig növesztettük, majd az állatokból kioperált tumorokat mechanikusan kb. 8 mm<sup>3</sup> darabokra vágtuk. Ezeket s.c. beültettük immunhiányos hím egerekbe. A tumor fajtájától függő ideig a tumorok méretét 40-50 mm<sup>3</sup>-re növesztettük az állatokban. Ekkor az állatokat kezelt és kontroll csoportokra osztottuk (8-10 állat/csoport). A kontroll csoportban az állatokat 0.1% dimetil-szulfoxidot (DMSO) és 10% propilénlikolt tartalmazó fiziológiás sóoldattal, míg a kezelt csoportot naponta kétszer vagy egyszer a vizsgált GH-RH antagonistá 40, 20 és 10 µg dóziséval s.c. kezeltük. A tumorok térfogatát mikro-tolómérővel való méréssel, valamint az állatok súlyát hetente meghatároztuk. A kísérletet akkor fejeztük be, amikor a kontroll csoportban a tumorok ugrásszerű növekedése miatt az állatok kezdtek elpusztulni. Ekkor az összes állat testsúlyát mértük, majd altatásban leöltük őket és megvizsgáltuk az állatokat, hogy volt-e metasztázisuk. A vérüket szeparáltuk az IGF-I és IGF-II szintek RIA-val történő meghatározás céljára. A tumorokat óvatosan kioperáltuk és mértük a tömegüket, majd minden tumorból mintát vettünk RIA és molekuláris biológiai vizsgálatok céljára.

Az alábbi humán tumor sejtvonalakkal végeztük el a fenti kísérleteket:

- 1) PC-3 és DU-145 androgéntől nem függő prosztatarák (48) [6], [21], [22];
- 2) MDA-MB-468 ösztrogén-független emlőrák (51);
- 3) Caki-1 vese adenocarcinoma (47);
- 4) SK-ES-1 és MNNG/HOS oszteoszarkóma [2];
- 5) HT-29 vastagbélrák [23];
- 6) SW-1990 pankreászrák (50);
- 7) NCI-H838 (183) és H460 nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) (184);
- 8) H-69 kissejtes tüdőrák (49, 185) [24], [25]; és DMS-153 kissejtes tüdőrák (186);
- 9) Non-Hodgkin limfóma [26];
- 10) HEC-1A endometriumtumor [27].

Egyes GH-RH antagonisták onkológiai hatását aranyhőrcsögökben is megvizsgáltuk (50). Nőnemű szíriai aranyhőrcsögökben (Frederick, MD, USA) *N*-nitrozobisz(2-oxo-propil)amin által pankreászrákot indukáltunk (187). Tizennyolc héttel a *N*-nitrozobisz(2-oxo-propil)amin kezelés után az állatokat 2 csoportra osztottuk, mindkét csoportban 14 hőrcsög volt. A kontroll csoport csak a vivőanyagot, míg a kezelt csoportban 10 µg GH-RH

antagonistát kaptak az állatok naponta egyszer i.p. adagolással. A kezelés 60 napig tartott (50).

## **IV. 7. 2. A $\beta$ peptidek *in vivo* vizsgálata**

### ***IV. 7. 2. 1. Extracelluláris egysejt-elvezetési elektrofiziológiai mérések***

Klorálhidráttal elaltatott, 37 °C-on temperált hím Wistar patkányok (300-360 g) fejét ú.n. sztereotaxikus kerettel rögzítettük, a koponyát felnyitottuk a hippocampus fölött és a kemény agyhártyát óvatosan eltávolítottuk. Az elektród lokalizálását sztereotaxikus atlasz (Paxinos and Watson, 1986) segítségével végeztük, majd egy idegsejten mértük az aktivitást a koponya felnyitása után 1 órával 7 $\mu$ m-es szén szálát tartalmazó mikroelektróddal [18]. Az akciós potenciálokat ExAmp-20 KB sejten kívüli sokszorozóval (Kation Scientific, Minneapolis, MN) felnagyítottuk és oszcilloszkóppal vizsgáltuk. A felnagyított jeleket összegyűjtöttük és 50 kHz frekvenciánál digitalizáltuk. A másodpercenkénti akciós potenciálokat computer segítségével megszámláltuk, valamint kiszámoltuk a peristimulus hisztogramokat és analízis céljára digitálisan tároltuk. A neuronokat a vizsgált peptidekkel percenként ingereltük 5 másodpercig tartó ismételt iontoforézissel. Az A $\beta$ (1-42) és a vizsgált peptid oldatának bejuttatása vagy párhuzamosan történt iontoforézissel („ko-iontoforézis”) vagy a két oldat keverékét előzetesen 1 órán át inkubáltuk és ezt az előkezelt oldatot juttattuk be iontoforézissel. A vizsgált sejtek helyzetének igazolására az utolsó mérés helyét festékkel megjelöltük és az agy eltávolítása és fixálása után hisztológiaiilag meghatároztuk a sztereotaxis koordinátákat. A felhasznált berendezések, oldatok, computer programok és statisztika részletesen a [18] közleményben találhatók.

### ***IV. 7. 2. 2. Mikrodialízis***

Fiatal felnőtt hím Wistar patkányok (300-350 g) fejét altatásban sztereotaxikus kerettel (Narishige, Japán) rögzítettük, a koponyát felnyitottuk és a jobboldali magnocellular nucleus basalisba (MBN) mikrodialízis szondát implantáltunk. Mesterséges cerebrospinális folyadéknak (ACSF), mint vivőanyagnak a mikrodialízisét az operáció után 24 órával kezdtük el, 60 perces ekvibrálás után 3 dialízis frakciót gyűjtöttünk össze. A patkányok

agyát Pr-IIIGL peptiddel 60 percig előkezeltük, majd 40 percig az A $\beta$ (1-42) oldatát infundáltuk 2 $\mu$ l/perc áramlási sebességgel. A kiáramló frakciókat 10 perces blokkokban összegyűjtöttük, amelyekből *orto*-ftálaldehiddel (OPA) történő derivatizálás után fluoriméterrel (Simadzu RF-10A, Svédország) meghatároztuk, hogy az A $\beta$ (1-42) excitotoxicitását mennyire védte ki a Pr-IIIGL peptid [28].

#### ***IV. 7. 2. 3. Viselkedési tesztek***

Az A $\beta$ (1-42) és Pr-IIIGL oldatával kezelt állatok spontán aktivitását az ú.n. nyílt porond tesztben 24 órával, a diszkriminatív tanulási és passzív elhárítási tesztben 14 nappal az operáció után végeztük. Az állatok egyik csoportja a 13. napon enyhe áramütést (1 mA, 3 másodperc) kapott, amikor a megvilágított ketrecből a sötétbe léptek, ezt a kísérletet 24 óra múlva megismételtük [28].



sorozatban előállított antagonist peptideknél az N-terminális acilezéseken kívül az alábbi szekvenciában és pozíciókban végeztünk helyettesítéseket [1]:

**X-[R<sup>1</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, R<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)**

X = H-, Ac-, izobutiril- (Ibu-), jód-acetil- (Iac-), bróm-propionil- (Br-Prop-), antrakinon-2-karbonil- (Aqc-), 1- és 2-naftil-acetil- (1- és 2-Nac-), 1- és 2-naftoil (1- és 2-Npt-)

R<sup>1</sup> = Tyr, His, Glu; vagy X-R<sup>1</sup> = Glt (Glutaroil-)

R<sup>15</sup> = Ala, Abu

R<sup>28</sup> = Ser, Asp

R<sup>29</sup> = Agm, Arg-NH<sub>2</sub>

A peptideket az Anyag és módszerek c. fejezetben ismertetett módon állítottuk elő és azonosítottuk. Az aminosav analízis és tömegspektrometriai mérések eredményei megegyeztek a várt értékekkel.

#### ***V. 1. 1. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok***

Az előállított 22 új vegyület [1] *in vitro* szuperfúziós vizsgálata során három peptid mutatott kiemelkedő gátló hatást (7. ábra):

**MZ-4-71:**

**[Ibu<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)**

**MZ-4-169:**

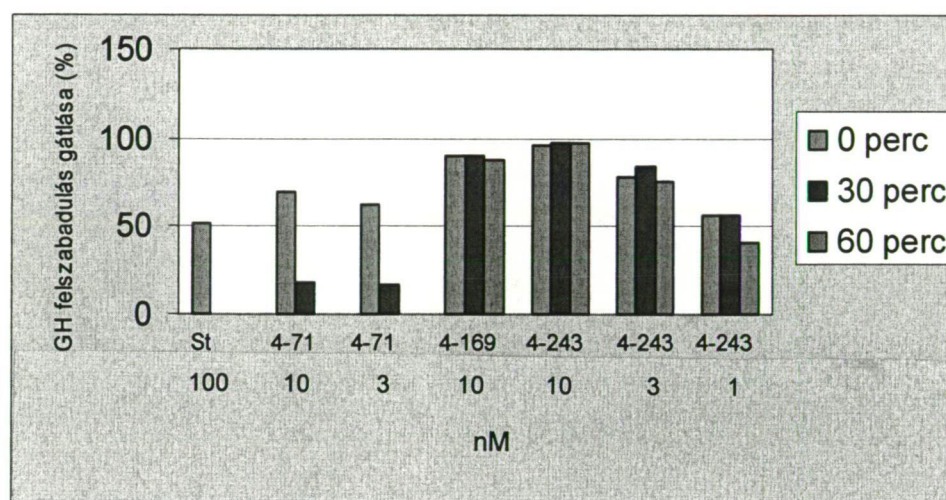
**[Nac<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGH-RH(1-29)-NH<sub>2</sub>**

**MZ-4-243:**

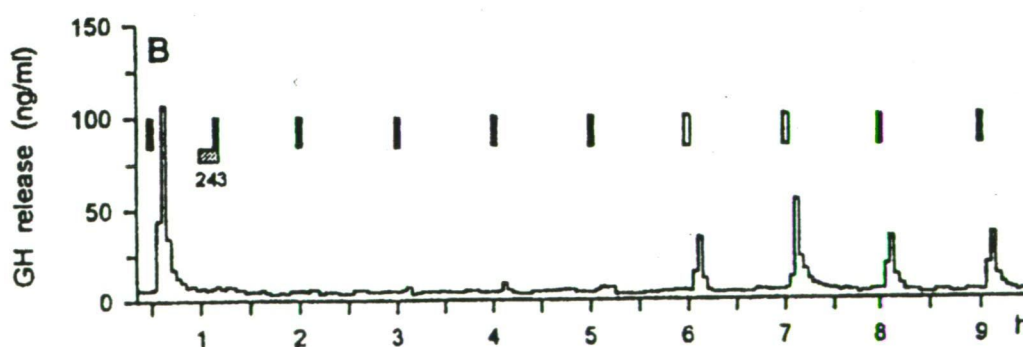
**[Nac<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)**

Ennek a három peptidnek a szerkezete nagyon hasonló, mindegyikben a 15-ös pozícióban Gly helyett α-amino-vajsav (Abu) található, amely ugyanúgy kedvező a molekula helikális térszerkezetének megtartása szempontjából, mint az agonistáknál bevált Ala<sup>15</sup>, de az Abu helyettesítés fokozta az antagonist aktivitást. Az MZ-4-71 izovajsavval (Ibu), míg az MZ-4-169 és MZ-4-243 antagonisták 1-naftil-ecetsavval (Nac) voltak acilezve. Az MZ-4-169 C-terminálisán a standard antagonistával megegyezően savamid szerepelt, az MZ-4-71 és MZ-4-243 pedig agmatint (dezkarboxi-arginin, Agm) tartalmazott.

A 7. ábrán jól látszik, hogy mindhárom antagonistá nagyobb mértékben gátolta a GH-RH által kiváltott GH felszabadulást 10 nM dózisban, mint a standard antagonistá (St) 100 nM-ban, amely ebben a viszonylag magas dózisban is csak 0 percnél gátolt, 30 percnél már nem. Az MZ-4-71-es peptid rövid hatásúnak mutatkozott a másik kettőhöz viszonyítva, míg az MZ-4-243-as vegyület, a [Nac<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) 1 nM dózisban 30 perc múlva is jobban gátolt, mint a standard antagonistá 100 nM-ban 0 percnél. Az MZ-4-243 antagonistá további *in vitro* vizsgálata során kiderült, hogy ez a peptid 30 nM dózisban a beadástól számított 5 óra múlva is 100%-ban gátolta a GH-RH által indukált GH felszabadulást (8. ábra) [29]. A GH-RH beadásra a válasz csak 6 óra múlva kezdett visszatérni, de a peptid gátló hatása még 9 óra múlva is több mint 50 % volt.



**7. ábra** GH-RH által kiváltott GH felszabadulás gátlása a standard antagonistával (St) (100 nM dózis), MZ-4-71 (10 és 3 nM dózis), MZ-4-169 (10 nM dózis) és MZ-4-243 (10 , 3 és 1 nM dózis) GH-RH antagonistákkal *in vitro* szuperfúziós tesztben.



**8. ábra** Az MZ-4-243 (30 nM dózis) antagonistá hatása a GH-RH által indukált GH felszabadulásra *in vitro* szuperfúziós tesztben.

Patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való kötődési vizsgálatok (1. táblázat) azt mutatták, hogy az MZ-4-71 peptid 26-szor, az MZ-4-169 és MZ-4-243 pedig 82- ill. 85-ször erősebben kötődött a hipofízis membrán preparátumhoz, mint a standard antagonistá [1].

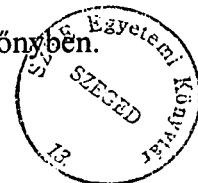
Peptid	$K_i$ (nM)	Relatív affinitás*
Standard antagonistá	$3.22 \pm 0.12$	1
MZ-4-71	$0.12 \pm 0.04$	26.18
MZ-4-169	$0.04 \pm 0.01$	82.56
MZ-4-243	$0.04 \pm 0.01$	85.12

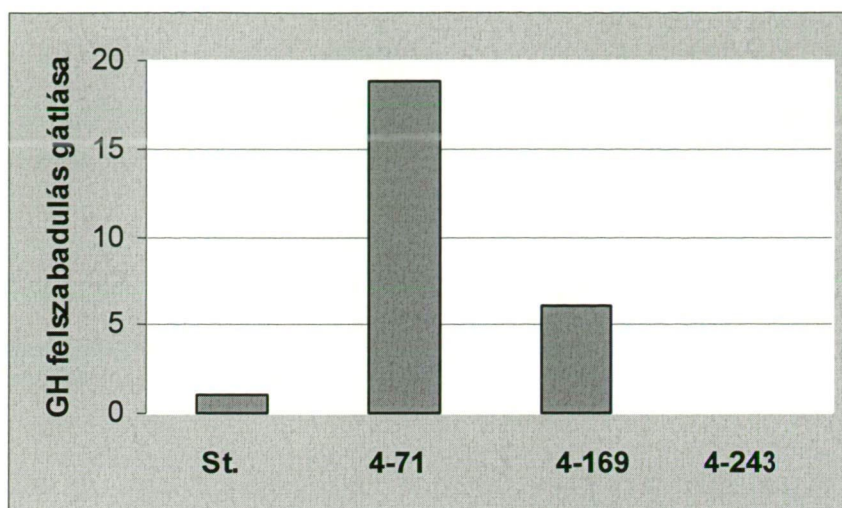
**1. táblázat** GH-RH antagonisták  $K_i$  (antagonista–receptor komplex disszociációs állandója) és patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való relatív affinitás (\*standard antagonistához viszonyított) értékei.

### V. 1. 1. 3. Az *in vitro* leghatásosabb GH-RH antagonisták *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* leghatásosabb antagonisták endokrin hatását *in vivo* kísérletekben is megvizsgáltuk patkányokban (9. ábra) i.v. kezelést alkalmazva [1]. Meglepő módon az MZ-4-71-es peptid, az [Ibu<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) gátolta legnagyobb mértékben a GH felszabadulást (19-szeres gátló hatás a standard antagonistához viszonyítva) az *in vivo* kísérletekben, míg az *in vitro* leghatásosabb MZ-4-243, a [Nac<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) az *in vivo* tesztben hatástalan volt. Az MZ-4-169 kódszámú antagonistá ( [Nac<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) ) 6-szor nagyobb mértékben gátolta a GH-RH által stimulált GH felszabadulást *in vivo*, mint a standard antagonistá.

Az MZ-4-71 és MZ-4-169 vegyületek csak az N-terminális acil csoportban és a C-terminális savamid csoportjának meglétében különböznek egymástól, de az *in vivo* hatásukban lényeges a különbség. Az MZ-4-71 (Ibu) és MZ-4-243 (Nac) viszont csak az N-terminálison különböznek. Az MZ-4-71 kiemelkedő gátló hatással rendelkezik *in vivo*, míg az MZ-4-243 hatástalan volt az *in vivo* vizsgálatokban. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy az izovajsavval történő acilezés *in vivo* is fokozza a peptidek antagonistá hatását. Mivel a GH-RH antagonisták *in vivo* hatása onkológiai tesztekben rendkívül fontos, ezért a későbbiekben az Ibu-val történő acilezést részesítettük előnyben.



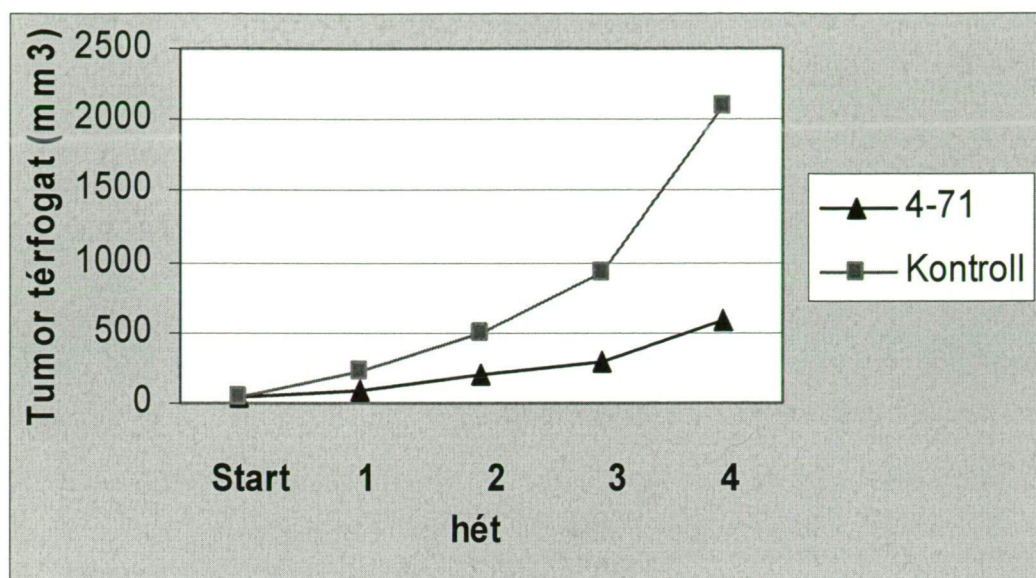


**9. ábra** GH felszabadulás gátlása a standard antagonistával (St) (100 µg/kg dózis) és az MZ-4-71 (80 µg/kg dózis), MZ-4-169 (80 µg/kg dózis) és MZ-4-243 (80 µg/kg dózis) GH-RH antagonistákkal *in vivo* tesztben.

#### ***V. 1. 1. 4. Az *in vivo* leghatásosabb antagonista onkológiai vizsgálata***

Az IGF-I-nek szerepe van a humán oszteoszarkóma, valamint kissejtes (SCLC) és nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) kialakulásában. Az első sorozat GH-RH antagonistái közül az *in vivo* legnagyobb gátló hatású MZ-4-71 peptiddel kezeltünk immunhiányos egerekbe transzplantált SK-ES-1 és MNNG/HOS humán oszteoszarkóma daganatokat, valamint H69 SCLC és H157 NSCLC tüdőrákot. Az állatokat s.c. kezeltük napi 40 µg antagonistával 4 hétig oszteoszarkóma és ugyancsak s.c. napi 2 x 20 µg peptiddel tüdőrák esetén. A GH-RH antagonista mindkét humán oszteoszarkóma és tüdőrák esetén is szignifikánsan gátolta a tumor növekedését. A **10. ábra** a tumorok méretének időbeli alakulását mutatja be a kezelt állatokban SK-ES-1 oszteoszarkóma esetén [2]. Az ábrán látható, hogy 4 hét kezelés után a kontroll csoportban a tumor mérete az eredeti 36-szorosára nőtt, míg az MZ-4-71 GH-RH antagonistával kezelt állatokban csak 11-szeresre. Mivel a kontroll csoportban a tumorok növekedése miatt csontsoványra fogyott állatok kezdtek elpusztulni, 4 hét után be kellett fejezni a kísérleteket. Ezekkel az onkológiai vizsgálatokkal elsőként bizonyítottuk, hogy humán tumorok növekedése gátolható GH-RH antagonistával.





**10. ábra** Az MZ-4-71 antagonistista (40 µg/nap) tumor térfogat növekedését gátló hatása immunhiányos egerekbe transzplantált SK-ES-1 humán osteosarcoma esetén.

	IGF-I	IGF-II
Kontroll	1408.2	618.5
4-71	435.3*	147.6*

**2. táblázat** IGF-I és IGF-II szintek H157 NSCLC tumorszövetben.

	IGF-I	IGF-II
Kontroll	118.6	28.1
4-71	18.4*	25.0

**3. táblázat** IGF-I és IGF-II szintek H157 NSCLC esetén májban.

A **2. táblázat** az IGF-I és -II szinteket mutatja be a kontroll és kezelt csoportban H157 NSCLC tumorszövetekben, a **3. táblázat** pedig májban a kísérlet befejezésekor. Az IGF-I szintek mind a tumorszövetben, mind a májban szignifikánsan csökkentek az MZ-4-71 GH-RH antagonistával történő kezelés hatására, az IGF-II szintek viszont csak a tumorban csökkentek szignifikánsan, májban alig változtak [3].

Az MZ-4-71 kódszámú GH-RH antagonisták onkológiai hatását Caki-I vese adenokarcinómának immunhiányos egerekbe az előzőkhöz hasonlóan történt transzplantálása után 2 héttel kezdődő kezeléssel is megvizsgálták. Az állatok naponta kétszer 20 µg antagonistát kaptak s.c.. Négy hét kezelés után a kezelt csoportban a tumorok térfogata szignifikánsan kisebb volt (47). A GH és IGF-I szintek a szérumban, az IGF-I és IGF-II koncentrációja a májban, valamint az IGF-I és IGF-II mennyisége a tumorban csökkent értékeket mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva. A GH-RH antagonistával Caki-I vesetumor kezelésében elért eredmények azért jelentősek, mivel előrehaladott stádiumú vese adenokarcinóma kezelésére jelenleg nincs hatásos terápia.

## V. 1. 2. Hidrofób aminosavak és citrullin beépítése

### V. 1. 2. 1. Tervezés és előállítás

A GH-RH antagonisták első sorozatának eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy az Agm C-terminálisú analógok nemcsak hatásosabbak, hanem a hatásuk elnyújtott is, szemben az Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> peptidekkel. Ezért a következő sorozatban előállított antagonistákban többnyire megtartottuk az Agm<sup>29</sup>-et a C-terminálison. Az első sorozat eredményeiből az is nyilvánvaló volt, hogy a Nac-val történő acilezés a molekula N-terminálisán hiába gátolta nagymértékben és elhúzódóan az *in vitro* GH felszabadulást, ez a hatás *in vivo* egyáltalán nem mutatkozott meg. Ezért a Nac-val történő acilezést a továbbiakban elvetettük. A fenti következtetéseket szem előtt tartva újabb antagonisták sorozatát terveztünk és állítottunk elő. Ezekben a peptidekben az első sorozatból megtartott helyettesítésekén kívül a 8-as pozícióban is végeztünk aminosav cserét és hidrofób aminosavakat építettünk be több pozícióban is. Irodalmi adatok alapján (191) ismert volt ugyanis, hogy egy vagy több hidrofób aminosav beépítése peptidhormon analógokba növelheti az analóg receptorhoz való kötődését és gyakran igen aktív agonistát vagy antagonistát eredményez. Mivel az N-terminálison történő acilezéssel tovább növelhető a peptidek hidrofób jellege, az egy aromás gyűrűt tartalmazó fenilecetsavval (PhAc) acileztük a peptidek egy részét. Azért választottuk a PhAc-at az N-terminális acilezésére, mert a korábbi GH-RH antagonistáink közül az Ibu-val acilezettek hatásos gátló analógot eredményeztek *in vivo* kísérletekben is, a két aromás gyűrűt tartalmazó Nac-analógok viszont csak *in vitro* voltak nagyon intenzív és elhúzódó hatásúak. Egyes analógoknál

megtartottuk az Ibu-t, de egy-két esetben acetileztük az N-terminálist vagy szabadon hagytuk. A Ser<sup>28</sup>-at néhány származékban a negatív töltésű Asp<sup>28</sup>-ra, ill. az apoláros Abu<sup>28</sup>-ra cseréltük. Az alábbi szekvenciában és pozíciókban végeztünk helyettesítéseket [30]:

**X-[R<sup>1</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, R<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)**

X = H-, Ac-, Ibu-, PhAc-

R<sup>1</sup> = Tyr, Tyr(Me)

R<sup>6</sup> = Cpa, Nal

R<sup>8</sup> = Asn, Abu, Ala, Phe, D-Leu

R<sup>15</sup> = Abu, Ala

R<sup>28</sup> = Ser, Asp, Abu

R<sup>29</sup> = Agm, Arg-NH<sub>2</sub>

Az antagonisták enzimrezisztenciáját az argininek helyére citrullin (Cit) beépítésével is fokozni kívántuk, ugyanis a GH-RH egyik bontó enzime egy tripszin-szerű enzim, amely bázisos aminosavak után hasítja a peptidkötést. Mivel a Cit az Arg töltés nélküli analógja, a molekulában lévő Arg-ket (az Arg<sup>20</sup> kivételével) Cit-nal helyettesítve arra a kérdésre is választ kaptunk, hogy szükség van-e az antagonista hatáshoz a pozitív töltésekre a molekulában. Mivel néhány peptid már előbb elkészült, mint az MZ-4-243 antagonista *in vivo* eredményei rendelkezésünkre álltak volna, Nac-val acilezett peptidek is vannak ebben a sorozatban. A natív hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> szekvenciájában az Ala<sup>2</sup>-t megtartva arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a C-terminálison a Cit<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> helyettesítés antagonistává változtatja-e a molekulát. Az előállított 9 új analóg az alábbi szekvenciában tartalmazott különböző helyettesítéseket ill. ezek kombinációit [31]:

**X-[R<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, R<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)**

X = Ibu-, PhAc-, H-, Nac-

R<sup>2</sup> = D-Cit, D-Arg, Ala

R<sup>8</sup> = Asn, Abu

R<sup>11</sup> = Cit, Arg

R<sup>29</sup> = Cit-NH<sub>2</sub>, Agm

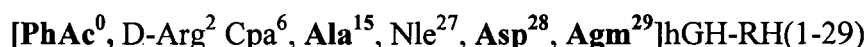
### ***V. 1. 2. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok***

Az előállított 20 új, hidrofób aminosav helyettesítéseket tartalmazó antagonisták [30] *in vitro* vizsgálata során az alábbi hat peptid mutatott kiemelkedő gátló hatást (7. ábra):

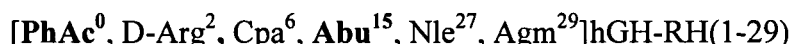
**MZ-5-78:**



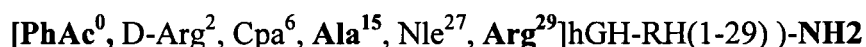
**MZ-5-116:**



**MZ-5-156:**



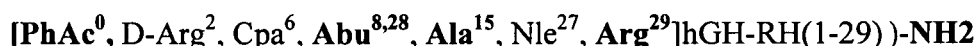
**MZ-5-186:**



**MZ-5-192:**



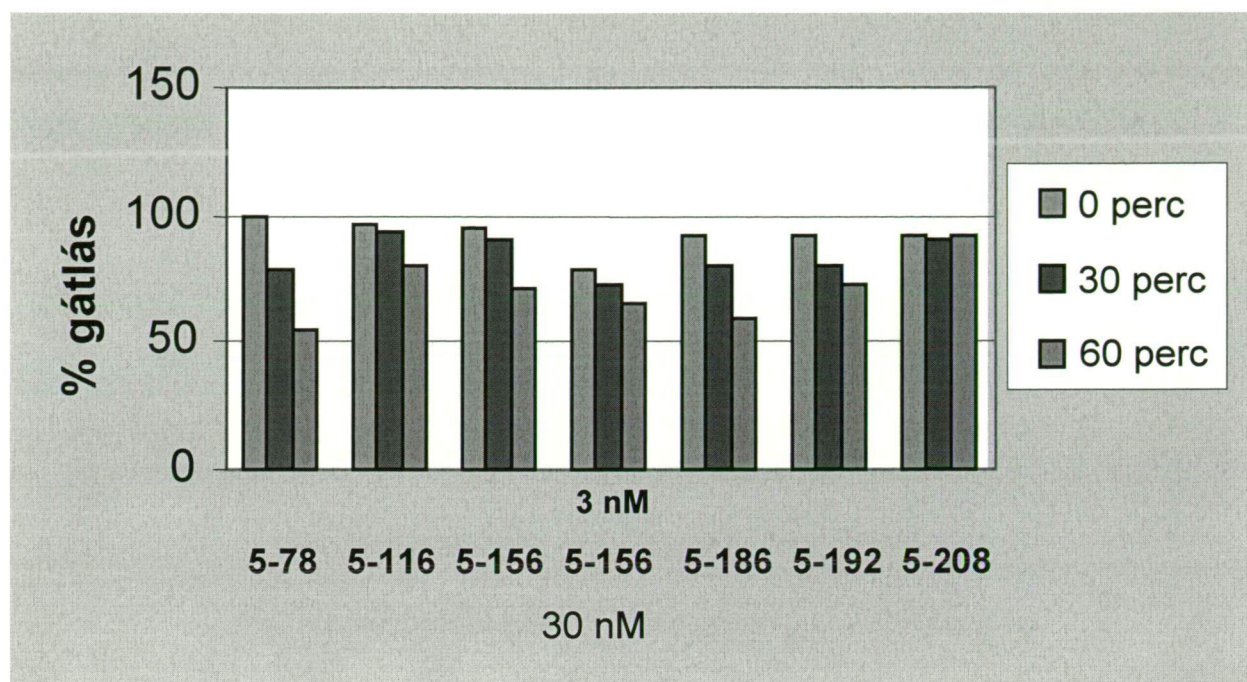
**MZ-5-208:**



Ezek mindegyike PhAc-val volt acilezve és mindegyikben Cpa volt a 6-os pozícióban, a Gly<sup>15</sup> helyett Abu vagy Ala és a C-terminálison két kivétellel (MZ-5-186 és MZ-5-208) Agm található. Két peptidben (MZ-5-192 és MZ-5-208) az Asn<sup>8</sup> helyett a hidrofób Abu<sup>8</sup> és ugyancsak két analógban (MZ-5-78 és MZ-5-116) a Ser<sup>28</sup> helyett Asp<sup>28</sup> szerepelt, míg az MZ-5-208 hidrofób jellegét az Abu<sup>8</sup>-on kívül tovább növelte a Ser<sup>28</sup> helyett beépített Abu<sup>28</sup>.

A 11. ábrán látható, hogy a 0 percnél kapott értékekhez képest a beadástól számított 60 perc múlva a peptidek gátló hatása már kisebb-nagyobb mértékben csökkent, de mindegyiknél még 50% fölé volt. Az *in vitro* szuperfúziós tesztben legnagyobb gátlást mutató hat antagonisták közül kiemelkedett a hidrofób MZ-5-208, amely 30 nM dózisban 60 percnél is 90%-ban, valamint az MZ-5-156 peptid, amely 30 nM dózisban 120 percnél is kb. 55%-ban gátolta a GH-RH által indukált GH felszabadulást [30], sőt 3 nM-ban még 60 percnél is 60%-nál nagyobb gátló hatást mutatott.





**11.ábra** GH-RH antagonisták (30 nM dózis), az MZ-5-156 peptid (30 és 3 nM dózis) standard antagonistához viszonyított %-os GH felszabadulást gátló hatása *in vitro* superfúziós testben.

Peptid	$K_i$ (nM)	Relatív affinitás*
Standard antagonista	$3.37 \pm 0.14$	1
MZ-5-78	$0.065 \pm 0.01$	51.8
MZ-5-116	$0.091 \pm 0.02$	37.0
MZ-5-156	$0.069 \pm 0.01$	48.8
MZ-5-186	$0.115 \pm 0.01$	29.3
MZ-5-192	$0.059 \pm 0.02$	57.1
MZ-5-208	$0.076 \pm 0.01$	44.3

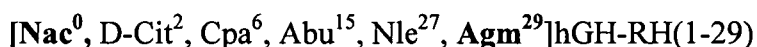
**4. táblázat** GH-RH antagonisták  $K_i$  (antagonista–receptor komplex disszociációs állandója) és patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való relatív affinitás (\*standard antagonistához viszonyított) értékei.

Az antagonisták kötődési vizsgálata (4. táblázat) azt mutatta, hogy a patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való relatív affinitások kb. 30-57-szer nagyobbak voltak, mint a standard antagonistáé, tehát erősebben kötődtek a patkány hipofízis membrán preparátumhoz, mint az első sorozatban mind *in vitro* mind *in vivo* leghatásosabb MZ-4-71. Ebben a sorozatban az MZ-5-192 peptid relatív affinitása volt a

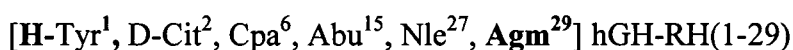
legnagyobb, 57-szerese a standard antagonistának, de nem érte el az első sorozatbeli Nac-val acilezett származékokét.

A Cit helyettesítést tartalmazó 9 peptid közül az alábbiak 30 nM-ban 0 percnél kb. 2-szer erősebben gátolták a GH felszabadulást, mint a standard antagonista 100 nM-ban, de ez a hatás már 30 percnél lecsökkent 39-53%-ra, kivéve az MZ-5-06 kódszámú peptidet, amely 60 percnél is még 85% gátlást mutatott (**12. ábra**).

**MZ-5-06:**



**MZ-5-10:**



**MZ-5-56:**



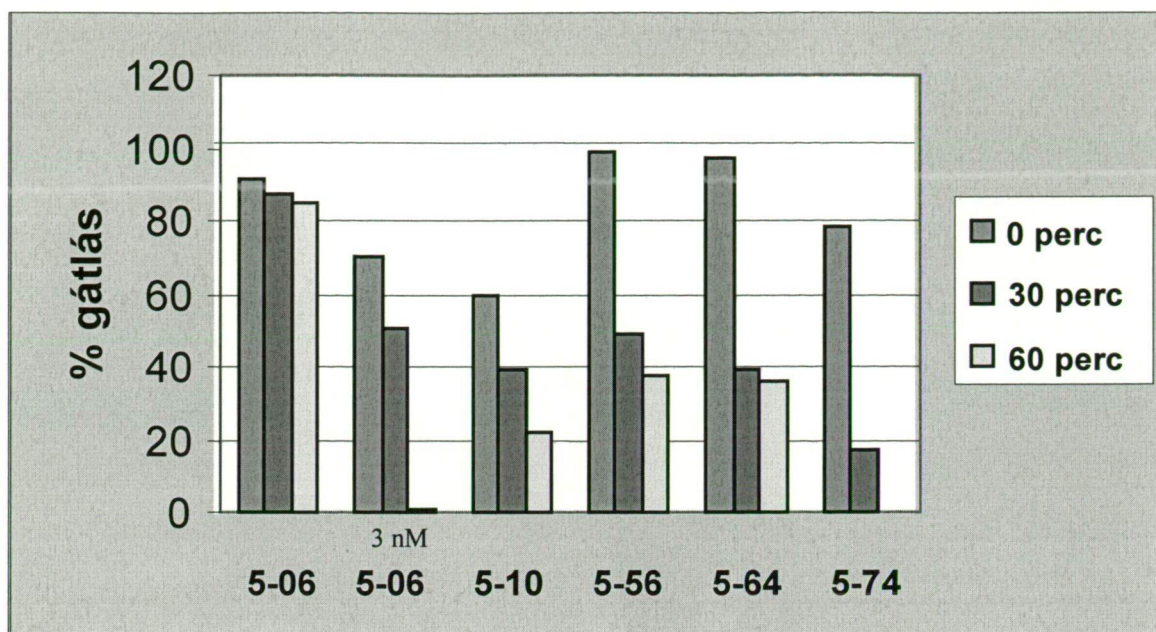
**MZ-5-64:**



**MZ-5-74:**



Az MZ-5-06 peptidnek a hosszantartó hatását (30 nm dózis) valószínű az N-terminálison Nac-val történt acilezés okozta az első sorozatbeli MZ-4-243-hoz hasonlóan, bár attól lényegesen rövidebb ideig tartott a hatása. Ebből arra következtettünk, hogy bár a D-Arg<sup>2</sup>-t D-Cit-ra cserélve megmarad az antagonista hatás, tehát a gátló hatás eléréséhez nem feltétlenül szükséges a pozitív töltés a 2-es pozícióban lévő aminosav oldalláncában, de a hatás rövidebb ideig tart és nem olyan intenzív. Az MZ-5-06 analóg 3 nM dózisban is jól gátolta a GH-RH által indukált GH felszabadulást 0 percnél (**12. ábra**), de ez a hatás csak rövid ideig tartott.



**12. ábra** Cit helyettesítéseket tartalmazó GH-RH antagonisták (30 nM dózis), (az MZ-5-06 peptid 30 és 3 nM dózis) standard antagonistához viszonyított %-os GH felszabadulást gátló hatásai *in vitro* szuperfúziós tesztben.

Két olyan peptid is készült, amelyekben a natív hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> szekvenciájában az Ala<sup>2</sup>-t megtartottuk és a C-terminálison a Cit<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>-ot építettünk be. Az egyik Ibu-val volt acilezve, a másik pedig dezamino-Tyr-t tartalmazott az 1-es pozícióban. Az Ibu N-terminálisú peptid 50%-os gátló hatást mutatott a szuperfúziós tesztben 0 percnél, de ez a hatás nem volt hosszantartó. A dezamino-Tyr<sup>1</sup>-t tartalmazó származék viszont semmi gátlást nem mutatott, sőt kismértékben fokozta a GH-RH által indukált GH felszabadulást, tehát a Cit<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> helyettesítés nem változtatta antagonistává a molekulát. Az MZ-5-56 peptid a korábbi MZ-4-71 Cit<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> analógja, az MZ-5-64 pedig az MZ-5-156 Cit<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> analógja. Ezeknél a Cit-analógoknál is rövidebb ideig tartott a gátló hatás, tehát ha a GH-RH antagonistában a 29-es aminosav oldalláncának térkitöltése hasonló az Arg-hoz, de nincs pozitív töltése (Cit), csökkent mértékben marad meg a peptid antagonista hatása [31]. Ezért a továbbiakban az Arg helyettesítését Cit-nal a 2-es, 11-es és 29-es pozícióban elvetettük.

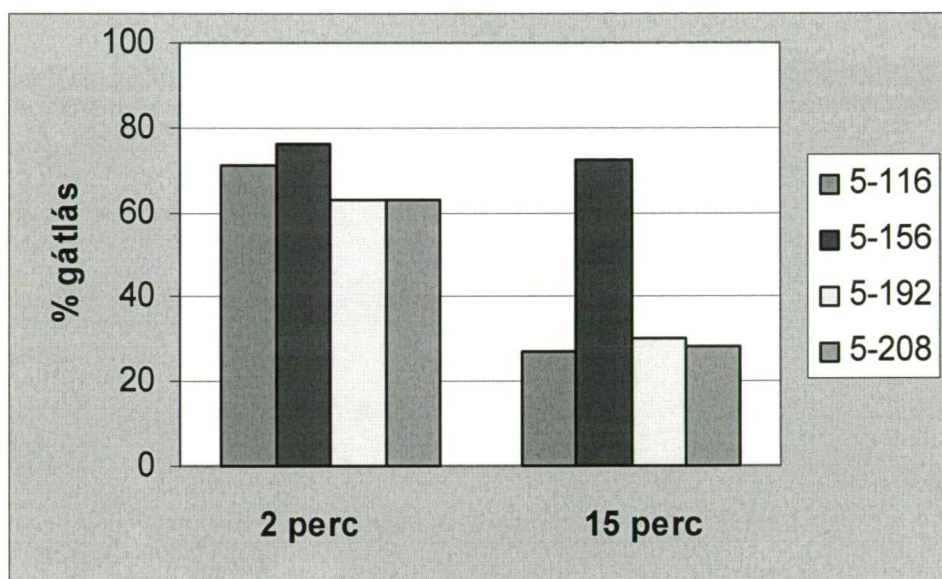
### V. 1. 2. 3. Az *in vitro* leghatásosabb GH-RH antagonisták *in vivo* vizsgálata

A második peptid sorozatban *in vitro* leghatásosabb analógok endokrin hatását *in vivo* patkány kísérletekben is megvizsgáltuk (13. ábra) i.v. kezelést alkalmazva. Mind a négy vizsgált peptid a beadás után 2 perccel 60%-nál nagyobb mértékben gátolta a GH felszabadulást a standard antagonistához viszonyítva. 15 perc után az MZ-5-156 peptid, a



[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup> Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) *in vivo* gátló hatása még alig csökkent (75%-ról 74%-ra), míg a 3 másik peptidé – közöttük az *in vitro* hosszantartó hatású MZ-5-208 – már 30% alatt volt [32].

Az MZ-5-156 csak az N-terminálist acilező csoportban (PhAc) különbözik az első sorozatbeli MZ-4-71-től (Ibu), az *in vivo* és az MZ-4-243-tól (Nac), az *in vitro* leghatásosabb antagonistá vegyülettől. Az egy aromás gyűrűt tartalmazó PhAc-val történő acilezés megnövelte a gátló hatást *in vivo*, sőt a beadás után még 15 perc múlva is gátolta a GH felszabadulást, míg a korábbi antagonisták nem.

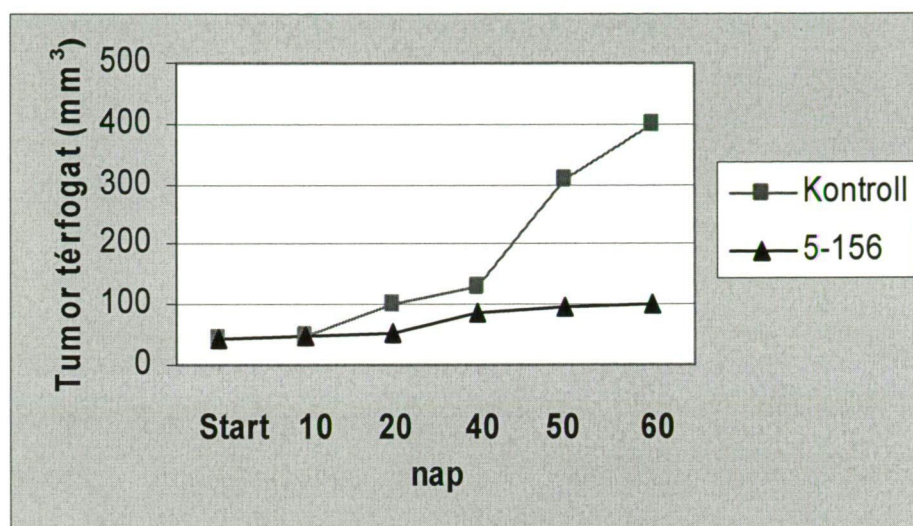


**13. ábra** GH felszabadulás gátlása az MZ-5-116, MZ-5-156, MZ-5-192 és MZ-5-208 GH-RH antagonistákkal (80 µg/kg dózis) *in vivo* tesztben patkányokban (i.v. kezelés).

GH-RH-t túlexpresszázó transzgenikus egereken (akromegália modell) is megvizsgáltuk az MZ-5-156 és a korábbi MZ-4-71 GH-RH antagonistáknak a GH és IGF-I túltermelésre kifejtett hatását, amelyet a hGH-RH túltermelődése okozott [33]. Mindkét vegyület (10-200 µg dózis) 1 órával az i.v. beadás után 39-72%-kal csökkentette a szérumban a GH szinteket. Az MZ-5-156 (50µg) gátló hatása transzgenikus egerekben 5 órán keresztül megmaradt.

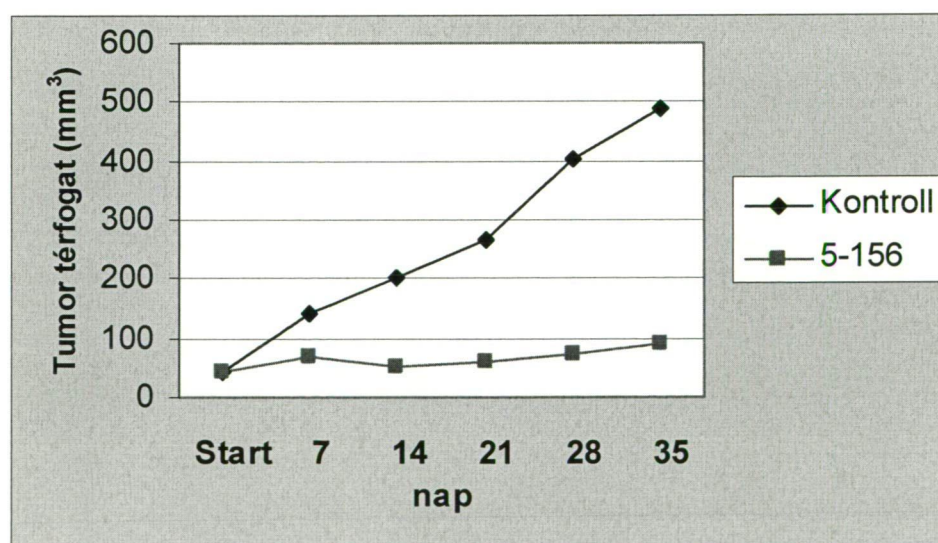
#### V. 1. 2. 4. Az MZ-5-156 antagonista onkológiai vizsgálata

Az IGF-nek szerepe van többek között a prosztata-, vastagbél- és tüdőrák kialakulásában (192). Az újabb GH-RH antagonisták közül az *in vivo* legnagyobb gátló hatást mutató MZ-5-156 peptiddel kezeltünk immunhiányos egerekbe transzplantált DU-145 androgén függő prosztatatumort (48, 193) (14. ábra), valamint MDA-MB-468 humán emlőrákot (51) (15. ábra) és HT-29 humán vastagbél daganatot [23] (16. ábra).



14. ábra

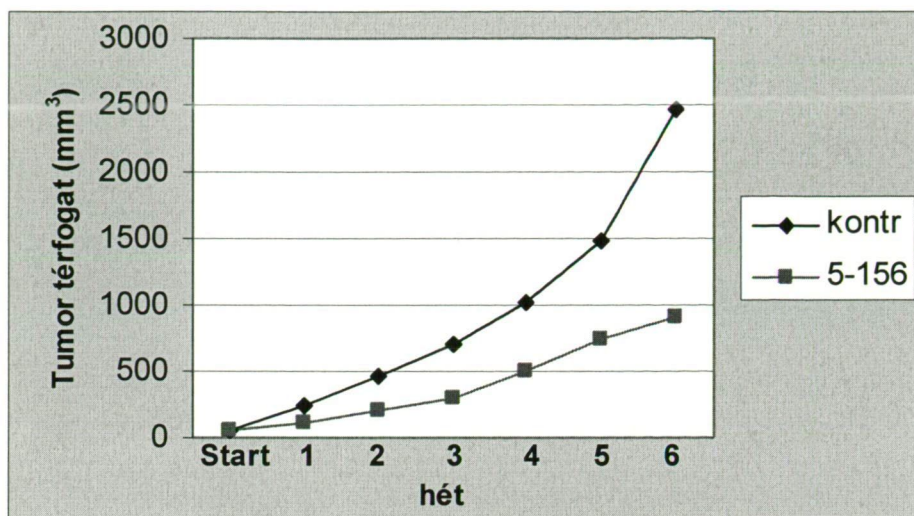
Az MZ-5-156 antagonista, [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup> Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29), (40 µg/nap) tumortérfogat növekedését gátló hatása DU-145 androgén-függő prosztatadaganat esetén.



15. ábra

Az MZ-5-156 antagonista (40 µg/nap) tumortérfogat növekedését gátló hatása MDA-MB-468 humán emlőrák esetén.





**16. ábra** Az MZ-5-156 antagonistá (40 µg/nap) tumortérfogat növekedését gátló hatása HT-29 humán vastagbél daganat esetén.

Az ábrákon látható, hogy DU-145 humán prosztata tumor (48) (14. ábra) esetén 60 napig tartó s.c. kezelés (40 µg/nap) és MDA-MB-468 humán emlőrák (51) (15. ábra) esetén 35 napig tartó ugyancsak s.c. kezelés (40 µg/nap) hatására a kezelt csoportban alig változott a tumorok mérete, míg a kontroll csoportokban a kiindulási 10-szeresére nőtt. Az MZ-5-156 szignifikánsan gátolta a tumorok térfogatának növekedését.

A HT-29 humán vastagbél tumor vizsgálatokban (16. ábra) 6 hét kezelés után a kontroll csoportban kezdtek elpusztulni az állatok, ezért a kísérletet be kellett fejezni. Az MZ-5-156 peptiddel kezelt állatokban a tumorok térfogata szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban [23].

Különböző daganatos megbetegedések esetén az egyik legrövidebb túlélés a pankréástumoros betegeknél van. A legtöbb hasnyálmirigy tumort csak előrehaladott stádiumban diagnosztizálják és jelenleg nincs hatásos kezelési lehetőség az ebben a betegségben szenvedők számára. Megvizsgáltuk immunhiányos egerekbe transzplantált SW-1990 humán pankréástumoron az MZ-4-71 és MZ-5-156 hatását. Mindkét GH-RH antagonistá szignifikánsan csökkentette a tumorok térfogatát és tömegét a kezelt állatokban, de az MZ-5-156 nagyobb mértékű gátlást eredményezett. A kezelésekre hatására az IGF-I szintje nem csökkent sem a szérumban, sem a tumorszövetben, amely arra utal, hogy az IGF-I-nek nincs hatása a hasnyálmirigy tumor növekedésének gátlására. Ezzel szemben az

IGF-II koncentrációjának szignifikáns csökkenése a tumorokban arra utal, hogy a vizsgált pankreász modellben az IGF-II-nek szerepe lehet a GH-RH antagonisták tumor növekedést gátló hatásában (50).

### V. 1. 3. GH-RH antagonisták ornitin helyettesítésekkel vagy laktámhíddal

#### V. 1. 3. 1. Peptidek tervezése és előállítása

Mivel az Orn nem szubsztrátja a tripszin-szerű enzimeknek, GH-RH agonistáknál az egyik, vagy mindkét Lys helyettesítése az *in vivo* potenciál növekedését eredményezte (194). Annak eldöntésére, hogy Orn beépítésével növekszik-e az *in vivo* hatás antagonistá származékoknál is, Orn-nel helyettesítettük a Lys<sup>12</sup>-t és Lys<sup>21</sup>-et, vagy mindkét Lys-t az alábbi antagonistá szekvenciában. Mivel a tripszin-szerű enzimek bázisos aminosavak után hasítanak, nemcsak a GH-RH molekában lévő lizineket, hanem az Arg<sup>11</sup>-et és Arg<sup>20</sup>-at is kicseréltük egy-egy antagonistá analógban Orn-re. Ezekben a helyettesítéseken kívül egyes analógokban az Asn<sup>8</sup> helyett Ser<sup>8</sup>-t, a Lys<sup>12</sup> helyett Nle<sup>12</sup>-t és a Lys<sup>21</sup> helyett Arg<sup>21</sup>-et is beépítettünk a molekulába. Az alábbi szekvenciában és pozíciókban végeztük a helyettesítéseket [34]:

X-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, Abu<sup>15</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)

X = Ibu-, PhAc-

R<sup>8</sup> = Asn, Ser

R<sup>11</sup> = Orn, Arg

R<sup>12</sup> = Orn, Lys, Nle

R<sup>20</sup> = Orn, Arg

R<sup>21</sup> = Orn, Lys, Arg

Az irodalomból ismert volt, hogy *i-(i+4)* laktámhidak növelik a hGH-RH (1-29) középső részének helikális jellegét, amely fontos szerepet játszik az agonista analógok receptorhoz való kötődésében és ezáltal a biológiai aktivitásokban is (195). Annak eldöntésére, hogy antagonistá analógok esetén is növekednek-e a biológiai hatások laktámhidat tartalmazó származékokban, 10 laktámhidat tartalmazó, új antagonistát állítottunk elő [35]. Ezekben a peptidekben a korábbi antagonistákból megtartottuk a D-

Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup> vagy Ala<sup>15</sup> és Nle<sup>27</sup> helyettesítéseket, az N-terminálist Ibu-val vagy PhAc-val acileztük és a C-terminálison Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> volt. Az *i*-(*i*+4) laktámhidakat a 8-12, 16-20, 17-21, 21-25 és 25-29 aminosavak oldalláncai között létesítettük, továbbá laktámhidat létesítettünk az 1-2 és 2-3 aminosavak között is a megfelelő aminosav származékokat beépítve a molekulába. Három peptid két laktámhidat is tartalmazott a 8-12 és 21-25 aminosavak között. A 8-12 híd kiépítéséhez felhasználtuk a Lys<sup>12</sup> oldallancát és a 8-as Asn-t Glu<sup>8</sup>-val vagy Asp<sup>8</sup>-val helyettesítettük. A 16-20 hidat egy Glu<sup>16</sup> és Lys<sup>20</sup>-t tartalmazó analóg oldalláncai között, a 17-21 hidat egy Glu<sup>17</sup> helyettesítés és a szekvenciában meglévő Lys<sup>21</sup>, a 21-25 hidat a Lys<sup>21</sup> és Glu<sup>25</sup> helyettesítés, a 25-29 hidat pedig D-Asp<sup>25</sup> és Orn<sup>29</sup> aminosav helyettesítések oldalláncai között létesítettük. A laktámhidakat a megfelelő oldallánc védőcsoportok eltávolítása után a hordozón képeztük.

### ***V. 1. 3. 2. Az Orn helyettesítéseket és laktámhidat tartalmazó GH-RH antagonisták in vitro biológiai vizsgálata***

Az előállított tíz Orn-t tartalmazó antagonisták közül kettő, a PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Orn<sup>12, 21</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) és az Ibu-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ser<sup>8</sup>, Orn<sup>12, 21</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29) 30 nM dózisban *in vitro* nagyobb mértékben gátolta a GH-RH-indukált GH felszabadulást, mint a standard antagonisták 100 nM-ban. Az első peptid még 60 percnél is hatásos volt (65% gátlás), de a második származék 30 percnél már alig volt hatásos (12%). A többi peptid *in vitro* hatása gyengébb volt. Várakozásunkkal ellentétben (194) az Orn helyettesítést tartalmazó antagonisták kevésbé gátolták a GH felszabadulást, mint az eredeti Lys-t tartalmazó szekvenciák.

Laktámhidat tartalmazó antagonisták közül három, a ciklo<sup>8, 12</sup> [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Glu<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>, a ciklo<sup>17, 21</sup> [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ser<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Glu<sup>17</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> és a ciklo<sup>8, 12; 21, 25</sup> [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Glu<sup>8, 25</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> 30 nM dózisban nagyobb mértékben gátolták a GH-RH által indukált GH felszabadulást, mint a standard antagonisták 100 nM-ban az *in vitro* szuperfúziós kísérletekben. A három peptid közül a ciklo<sup>17, 21</sup> [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ser<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Glu<sup>17</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub> esetén tapasztaltunk legnagyobb és elhúzódó antagonisták aktivitást [35]. Ez megközelítette a korábban szintetizált igen aktív antagonisták (MZ-4-71 és MZ-5-156) hatását, de a laktámhíd előállításának nehézsége miatt a későbbiekben nem építettünk be laktámhidat a GH-RH antagonistákba.



Az Orn helyettesítéseket és laktámhidat tartalmazó antagonisták *in vivo* tesztekben nem lettek megvizsgálva, mivel *in vitro* hatásuk vagy nem is érte el a korábbi nagyon hatékony GH-RH antagonistákét, vagy ha meg is közelítették, nem mutattak hosszan tartó hatást.

## V. 1. 4. GH-RH antagonisták módosításai az N-terminálison és az N-terminális környékén

### V. 1. 4. 1. Peptidek tervezése és előállítása

Az *in vivo* endokrin és onkológiai tesztekben is leghatásosabb GH-RH antagonistánkban, a [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup> Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Agm<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)-ban (MZ-5-156) további helyettesítéseket végeztünk, hogy megkíséréljük *in vivo* növelni az antagonista aktivitást, de a PhAc-val való acilezést, az Abu<sup>15</sup>-t és Nle<sup>27</sup>-et megtartottuk az újabb peptidekben és a C-terminálison Agm vagy Arg-NH<sub>2</sub> szerepelt. Az alábbi szekvenciában és pozíciókban végeztünk helyettesítéseket [36]:

PhAc-[R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, R<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)

R<sup>1</sup> = Tyr, Tic, D-Tic, Pal

R<sup>2</sup> = D-Arg, D-Tic, D-Tpi

R<sup>4</sup> = Asn, Ile, Phe, D-Phe

R<sup>6</sup> = Cpa, Phe(*p*NO<sub>2</sub>), Phe(*p*F), Phe(*p*Br), Phe(*p*I), Tic

R<sup>8</sup> = Asn, Aib

R<sup>9</sup> = Ser, Aib

R<sup>10</sup> = Tyr, Tyr(Me), Cpa,

R<sup>29</sup> = Agm, Arg-NH<sub>2</sub>,

### V. 1. 4. 2. *In vitro* biológiai és kötődési vizsgálatok

Az előállított 19 új antagonista peptid [36] *in vitro* szuperfúziós vizsgálata során csak a [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Phe(*p*F)<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) peptidnek volt 90%-nál nagyobb gátló hatása 0 percnél, de ez a hatás nem volt hosszantartó. A [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) érdekes módon 0 percnél

csak 83%-os gátlást mutatott, de ez a hatás 30 percnél 90% fölött volt és elhúzódó volt. A hasonló szerkezetű, de a 6-os pozícióban a Cpa jód-analógját (Phe(pI)<sup>6</sup>) tartalmazó [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Phe(pI)<sup>6</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) peptid hasonló *in vitro* hatást mutatott. Mivel ennek Tyr(Me)<sup>10</sup> nélküli analógja kisebb gátló hatással rendelkezett, arra következtettünk, hogy a Tyr(Me)<sup>10</sup>-nek lehet szerepe az elhúzódó *in vitro* hatásban, ezért a Tyr(Me)<sup>10</sup>-t később is beépítettük GH-RH antagonistákba.

A patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való kötődési értékeket a [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) peptidéhez viszonyítottuk, amely az Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> analógja a korábbi leghatásosabb antagonistának, az MZ-5-156-nak. Néhány peptid kötődése ezt megközelítette, de csak egy peptid volt magasabb: [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29). Ebben a sorozatban ez a vegyület - az MZ-5-156 peptid Tyr(Me)<sup>10</sup>-et és Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>-ot tartalmazó analógja - volt a szuperfúziós tesztben az egyik leghatásosabb antagonistája és ez a peptid kötődött legnagyobb mértékben a membrán preparátumhoz. Korábbi antagonistáink között az Agm<sup>29</sup> C-terminálisú peptidek hatásosabbak voltak az Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> analógoknál, ezért a fenti esetben a Tyr(Me) nemcsak kompenzálta az Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>-ot, hanem a gátló hatást fokozta is.

#### ***V. 1. 4. 3. In vivo vizsgálatok***

Az ebben a peptid sorozatban legjobb kötődési értékeket mutató és a szuperfúziós tesztben leghatásosabb peptidek gátló hatását *in vivo* is megvizsgáltuk patkányokban. Legnagyobb mértékű gátló hatást a [PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) antagonistája mutatott, de a gátló hatása nem érte el a korábbi leghatásosabb antagonisták vegyületeinknek, az MZ-5-156-nak az *in vivo* gátló hatását. Ezért ezeket a vegyületeket onkológiai tesztekben nem vizsgáltuk meg.

### **V. 1. 5. Változtatások a C-terminálison és Arg cserék**

#### ***V. 1. 5. 1. Peptidek tervezése és előállítása***

A korábbi GH-RH antagonisták eredményeiből levont következtetések alapján néhány módosítástól eltekintve megtartottuk a PhAc-val történő acilezést az N-terminálison, valamint a D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup> és Nle<sup>27</sup> helyettesítéseket az antagonistákban és

több molekulába beépítettük a Tyr(Me)<sup>10</sup>-et is. A C-terminálison nemcsak megtartottuk a pozitív töltést, hanem növeltük a pozitív töltések számát több Arg vagy D-Arg és homoArg ( $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -guanidino-hexánsav, Har) beépítésével:

**X-[R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, Y]hGH-RH(1-29)**

X = PhAc, Nic, Ph(pOH)Ac

R<sup>2</sup> = D-Arg, D-Met

R<sup>3</sup> = Asp

R<sup>8</sup> = Asn, Aib, Abu, D-Abu

R<sup>9</sup> = Ser, Aib

R<sup>10</sup> = Tyr, Tyr(Me)

Y = C-terminális = D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>, Arg<sup>28</sup>-D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>, D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>, Arg<sup>27</sup>-D-Arg<sup>28</sup>-NH<sub>2</sub>, Arg<sup>29</sup>-D-Arg<sup>30</sup>-NH<sub>2</sub>, D-Arg<sup>27</sup>-Arg<sup>28</sup>-D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>

Az előállított 27 új GH-RH antagonisták ezeknek a helyettesítéseknek a kombinációit tartalmazta. A fenti helyettesítéseken kívül a PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29) szekvenciában megvizsgáltuk az Arg-cserének, tehát még egy pozitív töltésnek a GH-RH által indukált GH felszabadulás gátlására kifejtett hatását. A következő pozíciókba építettünk be L- vagy D-Arg-t: D-Arg<sup>1</sup>, Arg<sup>3</sup>, Arg<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup>, Arg<sup>9</sup>, Arg<sup>15</sup>, Arg<sup>16</sup>, Arg<sup>18</sup>, Arg<sup>19</sup>. A töltés nélküli, nem elágazó láncú Nle-ra is kicseréltünk aminosavakat ugyanebben a peptid szekvenciában a következő helyeken: D-Nle<sup>2</sup>, Nle<sup>9</sup>, Nle<sup>15</sup>, Nle<sup>16</sup>, Nle<sup>18</sup>, Nle<sup>19</sup> [37]. Ezek a helyettesítések újabb 15 GH-RH antagonistát eredményeztek. Miután a szuperfúziós vizsgálatok eredményeiből kiderült, hogy a C-terminálison a D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> alkalmazása (MZ-6-55), valamint az Arg<sup>9</sup> analóg (JV-1-36) igen erős és hosszantartó gátló hatást eredményezett, ezeket a helyettesítéseket kombináltuk, ill. Har<sup>9</sup>-et és Tyr(Me)<sup>10</sup>-et is beépítettünk a molekulába, így újabb 8 antagonistát állítottunk elő [37].

#### ***V. 1. 5. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok***

Az előállított 27 + 15 + 8 új antagonistá peptid [37] *in vitro* szuperfúziós vizsgálata során a következő 3 analóg igen erős és hosszantartó gátló hatásának mutatkozott:

##### **MZ-6-55**

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

##### **JV-1-36**

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### JV-1-38

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Har<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

A három peptid közül a JV-1-36 volt a leghatásosabb *in vitro*, 30 nM dózisban még 120 percnél is 94%-ban gátolta a GH-RH által kiváltott GH felszabadulást, 3 nM-ban adva viszont alig volt hatásos.

A patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való kötődési vizsgálatokban a JV-1-36 antagonistá 70-szer, az MZ-6-55 peptid 40-szer és a JV-1-38 pedig 37-szer nagyobb mértékben kötődött a membrán preparátumhoz, mint a standard antagonistá.

Mivel a Ser<sup>9</sup> cseréje Arg-re vagy Har-re és a C-terminálison a D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> nagymértékű és hosszan tartó gátló hatást eredményezett, ezeket a cseréket a későbbi, új antagonistákban is alkalmaztuk.

#### 5. 1. 5. 3. Az *in vitro* leghatásosabb GH-RH antagonisták *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* leghatásosabb analógok endokrin hatását is megvizsgáltuk az előzőekhez hasonlóan *in vivo* patkány kísérletekben. Az antagonisták i.v. beadása után 5 perccel a JV-1-36 95%-ban, az MZ-6-55 84%-ban, míg a JV-1-38 csak 68%-ban gátolta a GH felszabadulást. A JV-1-36 már nem gátolt 60 percnél, de az MZ-6-55 38% és JV-1-38 34% gátlást mutatott még 60 percnél is. Ezek voltak eddig az *in vivo* leghosszabb gátló hatást mutató GH-RH antagonisták [37].

#### 5. 1. 5. 4. Onkológiai vizsgálatok

A JV-1-36 és MZ-5-156 antagonisták hatását immunhiányos egerekbe transzplantált U-87MG humán glioblasztóma tumorokon is megvizsgáltuk. Mindkét peptid szignifikánsan csökkentette a tumorok méretét és az IGF-II mRNS szinteket a tumorokban (30).

HT-29 humán vastagbél tumor vizsgálatokban a JV-1-36 peptiddel kezelt állatokban a tumorok térfogata szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban, de nem gátolta nagyobb mértékben a tumorok növekedését, mint az MZ-5-156 peptid [23].

A JV-1-38 antagonistista (20 µg/nap dózis) szignifikánsan gátolta az MDA-MB-435 humán ösztrogén-független emlőrák növekedését és megakadályozta a metasztázisok kialakulását (196). A PC-3 humán prosztata tumor növekedését is gátolta és a szomatosztatin analóggal kombinált kezelés tovább fokozta a gátló hatást (197).

## V. 1. 6. A 8, 9 és 10-es aminosavak cseréje

### V. 1. 6. 1. Peptidek tervezése és előállítása

A korábbi GH-RH antagonistákkal kapott eredményeinkből levont következtetések alapján megtartottuk a PhAc-val történő acilezést az N-terminálison, valamint a D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup> és Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> helyettesítéseket az antagonistákban. Az új antagonistista sorozatban elsősorban a 8, 9, és 10-es pozícióban végeztünk helyettesítéseket [19].

**PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)**

R<sup>8</sup> = Asn, Ala, D-Ala, Abu, Cit

R<sup>9</sup> = Arg, D-Arg, Har, Amp, Cit

R<sup>10</sup> = Tyr, Tyr(Me), Tyr(Et), Amp, His, Cha, Dip, 3-Pal, Phe(*p*NH<sub>2</sub>), Phe(*p*NO<sub>2</sub>)

### 5. 1. 6. 2. *In vitro* biológiai és kötődési vizsgálatok

A fent leírt helyettesítések kombinációival 21 új antagonistista peptidet állítottunk elő [19]. Az *in vitro* szuperfúziós vizsgálatok során a következő analógok igen erős és hosszantartó gátló hatásúnak mutatkoztak:

#### **MZ-J-7-72**

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Cit<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### **MZ-J-7-74**

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Cit<sup>8</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH  
(1-29)

#### **JV-1-62**

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Amp<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### JV-1-63

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Har<sup>9</sup>, Amp<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### JV-1-68

PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Amp<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

Az *in vitro* szuperfúziós tesztben az MZ-J-7-74 antagonistá 30 nM dózisban 100%-os gátló hatást mutatott 0 percnél, de a JV-1-63 is 93%-ban gátolta a GH-RH által kiváltott GH felszabadulást 0 percnél. Mind a négy analóg 30 nM dózisban 120 percnél is 63-97%-os gátló hatású volt.

A patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való kötődési értékeket a standard antagonistáéhoz viszonyítva a fenti 4 antagonistá közül a JV-1-62 mutatta a legerősebb (86-szoros) kötődést. A másik három peptid is 66-79-szer erősebben kötődött, ezeken kívül még 6 új analóg mutatott a standard antagonistánál 67-70-szer erősebb kötődést [19].

#### V. 1. 6. 3. *In vivo* vizsgálatok

A szuperfúziós tesztben leghatásosabb és legjobb kötődési értékeket mutató peptidek gátló hatását *in vivo* is megvizsgáltuk patkányokban. Legnagyobb mértékű gátló hatást (91%) 5 percnél az MZ-J-7-74 peptid mutatott, de 60 percnél már nem gátolt. A JV-1-62 és JV-1-63 peptid elnyúlt hatásúnak bizonyult az *in vivo* tesztekben, még 60 percnél is 62 ill. 47 % gátló hatásuk volt. Ezeket a vegyületeket onkológiai tesztekben is megvizsgáltuk. Az MZ-J-7-72 analóg (Cit<sup>9</sup>), amely *in vitro* a legaktívabb antagonisták között volt, meglepő módon *in vivo* tesztben csak 5 percnél mutatott erős gátló hatást (82%), de már 15 perc múlva alig gátolt (20%). Hiába bontják a tripszin-szerű enzimek az Arg<sup>9</sup> után a peptidet és a Cit<sup>9</sup> nem szubszttrátja ezeknek az enzimeknek, eredményeink azt bizonyítják, hogy a 9-es pozícióban a pozitív töltés előnyös az antagonistákban a GH felszabadulást gátló hatás fokozásához.

Korábban is előfordult, hogy az *in vitro* igen nagy hatású antagonisták *in vivo* gyenge aktivitásúak voltak vagy egyáltalán nem volt hatásuk, mint pl. az MZ-4-243 peptid. Eredményeink alapján úgy tűnik, nem lehet előre megjósolni az *in vitro* eredményekből, hogy mely peptidek lesznek a leghatásosabbak *in vivo*.

#### 5. 1. 6. 4. Onkológiai vizsgálatok

A JV-1-65, amely *in vitro* csak közepes, de elhúzódó antagonistá hatású volt, *in vivo* pedig 5 percnél is alig gátolta a GH felszabadulást (15 %), szignifikánsan csökkentette a DMS-153 (186) humán SCLC és PC-3 prosztata tumorok proliferációját immunhiányos egerekben. Ezzel szemben a JV-1-63, amely *in vivo* patkánykísérletekben nagymértékben gátolta a GH-RH által indukált GH felszabadulást, sokkal kevésbé volt hatásos onkológiai tesztekben. Tehát a GH-RH antagonistáknak az *in vivo* GH felszabadulást gátló hatása nem korrelál minden esetben az onkológiai tesztekben mért tumornövekedést gátló hatással.

### V. 1. 7. Zsírsavakkal történő acilezések GH-RH antagonistákban

#### V. 1. 7. 1. Peptidek tervezése és előállítása

A szintetikus peptidek gyógyszerként való felhasználását limitálja a biológiai hozzáférhetőség. A klinikai fejlesztésre kiválasztott GH-RH antagonistáknak nemcsak nagy biológiai hatásokkal kell rendelkezniük, de nagy affinitással is kell kötődniük mind a hipofízis GH-RH receptorhoz, mind a tumorokban lévő splice variánsaikhoz. Általánosan elfogadott, hogy a peptid-membrán kölcsönhatások fokozhatók a peptid lipofil jellegének növelésével. A lipopeptideknek általában nincs mellékhatásuk, nem váltanak ki gyulladásos reakciókat és hosszú a fél-életidejük (198). Az irodalomban már közölték, hogy a szomatosztatin N-terminálisát hosszú szénláncú zsírsavval acilezve nemcsak a peptid stabilitása nőtt meg, de az antiproliferatív hatása is fokozódott humán emlő adenocarcinoma sejteken (199).

A GH-RH antagonisták biológiai hatásának és receptor affinitásuk fokozására elkészítettük a korábban *in vitro* és *in vivo* igen hatásos JV-1-36 és az onkológiai vizsgálatokban ugyancsak igen hatásos JV-1-65 különböző hosszúságú, páros szénatomszámú mono- és  $\alpha,\omega$ -dikarbonsavakkal acilezett származékait [6]. Néhány antagonistába beépítettük a Cit<sup>8</sup>-Cit<sup>9</sup>-et, illetve az Amp<sup>9</sup>-Tyr(Me)<sup>10</sup>-et. Az Amp<sup>9</sup>-Tyr(Me)<sup>10</sup> helyettesítést tartalmazta a JV-1-65 peptid, amely onkológiai vizsgálatokban kiváló tumor növekedést gátló hatásokat mutatott. Ezeket a peptideket a leghatásosabb mono- (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-) és dikarbonsavakkal (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO- és HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CO-) acileztük. Összesen 21 antagonistát állítottunk elő az alábbi szekvenciában történő helyettesítésekkel:

**X-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)**

X = CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-,  
CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CO-,  
CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CO-, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CO-,  
CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CO-

R<sup>8</sup> = Asn, Cit

R<sup>9</sup> = Arg, Amp, Cit

R<sup>10</sup> = Tyr, Tyr(Me)

### ***V. 1. 7. 2. In vitro biológiai és kötődési vizsgálatok***

Az *in vitro* szuperfúziós vizsgálatok során a következő, zsírsavakkal acilezett analógok voltak a leghatásosabbak:

#### **MZ-J-7-50**

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### **MZ-J-7-46**

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### **MZ-J-7-42**

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>, NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### **MZ-J-7-44**

HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

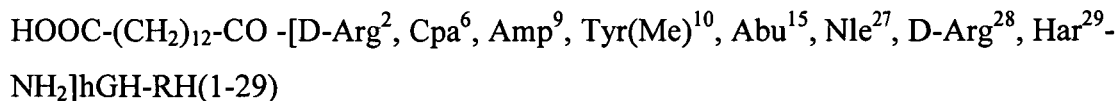
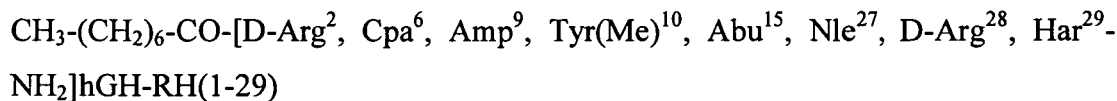
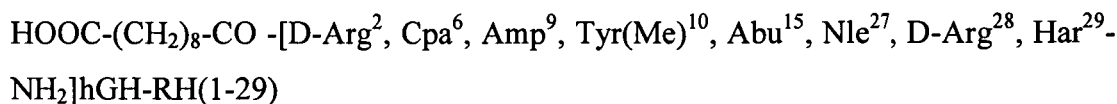
#### **MZ-J-7-30**

HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Arg<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

Ezek a peptidek az *in vitro* szuperfúziós tesztben túlszárnyalták a JV-1-36 hatását. Az oktánsavval acilezett MZ-J-7-46-os peptid igen erős és hosszantartó gátló hatásának mutatkozott, ez volt a legaktívabb antagonist, 90 percig majdnem teljesen gátolta a GH-RH által kiváltott GH felszabadulást 30 nM dózisban, de még 120 percnél is 60%-os volt a gátló hatása [6].

Az onkológiai vizsgálatokban nagyhatású JV-1-65 Amp<sup>9</sup>-Tyr(Me)<sup>10</sup> helyettesítést tartalmazott. A következő JV-1-65 analógokban az N-terminális PhAc-t zsírsavakkal helyettesítettük:



**MZ-J-7-110****MZ-J-7-114****MZ-J-7-116**

Ezek az analógok az *in vitro* szuperfúziós tesztben valamivel gyengébbek voltak, mint a JV-1-65, de a gátló hatásukat 120 percig megtartották. Az MZ-J-7-110 volt a leghatásosabb a három zsírsavval acilezett analóg közül.

A szuperfúziós vizsgálatokban hatásos antagonisták proliferációt gátló hatását is megvizsgáltuk *in vitro* MiaPaCa-2 humán pancreas ráksejteken MTT tesztel. Azért választottuk a MiaPaCa-2 sejtvonalat, mert ez a sejtvonal expresszálja a GH-RH receptor splice variánsait, míg olyan receptorok, mint pl. a VIP, PACAP, szekretin vagy glukagon, amelyek zavarhatnák a méréseket, nincsenek jelen [4]. Hat analóg szignifikánsan csökkentette a proliferáció mértékét  $3 \times 10^{-6}$  M koncentrációban, közöttük volt a szuperfúziós tesztben is nagy hatású MZ-J-7-42 és MZ-J-7-30. Ezek az antagonisták nagyobb mértékben gátolták az *in vitro* proliferációt, mint a JV-1-36, amely nem gátolt szignifikánsan és a JV-1-65 pedig ebben a koncentrációban egyáltalán nem mutatott gátló hatást az MTT tesztben. A peptideket  $10^{-5}$  M koncentrációban alkalmazva minden új antagonista (kivéve a hexánsavval és adipinsavval acilezteket) szignifikáns antiproliferatív hatást mutatott és szignifikánsan nagyobb mértékben gátolták a proliferációt, mint a JV-1-36 ebben a koncentrációban. Az MZ-J-7-110 és MZ-J-7-114 antagonisták is szignifikánsan nagyobb antiproliferatív hatást mutattak, mint a JV-1-65 peptid  $10^{-5}$  M koncentrációban [6].

A patkány hipofízis elülső lebenyéből izolált membrán preparátumhoz való kötődési értékeket a standard antagonistához viszonyítva a fenti 5 antagonista közül az MZ-J-7-46 peptid, tehát az oktánsavval acilezett, mutatott legnagyobb, 100-szor erősebb kötődést, mint a standard antagonista. Ez az egyetlen GH-RH antagonista eddig, amely 100-szor erősebben kötődik a hipofízis membránhoz, mint a standard antagonista. A másik négy peptid kötődése 66-79-szer volt nagyobb és a fenti peptideken kívül még 6 új analóg mutatott 67-70-szer erősebb kötődést a membrán preparátumhoz, mint a standard antagonista [6]. Azt

tapasztaltuk, hogy bizonyos zsírsavakkal történő acilezés megnövelte az analógok receptorhoz való kötődését a kiindulási JV-1-36-hoz képest, de a legnagyobb mértékű növekedést az oktánsavval történő acilezés eredményezte.

Az  $\text{Amp}^9\text{-Tyr(Me)}^{10}$  helyettesítést tartalmazó, zsírsavakkal acilezett három JV-1-65 analóg (MZ-J-7-110, MZ-J-7-114 és MZ-J-7-116) erősebben kötődött a receptorhoz, mint a JV-1-65.

### ***V. 1. 7. 3. In vivo vizsgálatok***

Az *in vitro* vizsgálatokban igen hatásos antagonisták közül csak két peptid gátolta szignifikánsan a GH-RH által kiváltott GH felszabadulást *in vivo* kísérletekben, az MZ-J-7-46 és MZ-J-7-110, de a gátló hatásuk nem érte el a JV-1-36 *in vivo* hatását [6].

### ***5. 1. 7. 4. Onkológiai vizsgálatok***

Néhány peptidet megvizsgáltunk különböző tumor modellekben is. Az MZ-J-7-114 antagonistá immunhiányos egerekben 5 µg napi dózist alkalmazva szignifikánsan gátolta a PC-3 humán androgéntől független prosztata daganat növekedését és csökkentette a szérumban IGF-I szintet is, míg a korábbi egyik leghatásosabb antagonistá (JV-1-38) még 10 µg dózisban sem volt hatásos [6].

Az MZ-J-7-114 antagonistá immunhiányos egerekben 10 µg napi dózist alkalmazva szignifikánsan gátolta a H460 és A549 humán NSCLC tumorok növekedését (200).

Immunhiányos egerekben H-69 humán SCLC tumorok növekedését mind az MZ-J-7-110, mind a JV-1-65 szignifikánsan gátolta 10 µg napi dózist alkalmazva, de az MZ-J-7-110 antagonistával nagyobb mértékű gátlást lehetett elérni, mint a JV-1-65-tel [25].

A korábbi GH-RH antagonisták, mint pl. a JV-1-36 és JV-1-38 immunhiányos egerekben napi 20 µg dózisban gátolták a PC-3 és más tumorok növekedését. Az újabb GH-RH antagonisták, mint pl. JV-1-65 már napi 10 µg dózisban is hatásos volt az onkológiai kísérletekben. A JV-1-38 és JV-1-65 viszont csak kis mértékben és nem szignifikáns módon gátolta a GH felszabadulást patkányokban *in vivo*. A zsírsavakkal acilezett MZ-J-7-110 és MZ-J-7-114 GH felszabadulást gátló hatása *in vivo* patkányokban csak mérsékelten növekedett a JV-1-65 és JV-1-38 referencia analógok *in vivo* endokrin hatásához képest. Ennek ellenére szignifikánsan nagyobb mértékű gátló hatásuk volt a fentebb említett tumorokon. Ez arra utal, hogy ezek az antagonisták valószínűleg a tumorokban lévő GH-RH



receptorokra kifejtett közvetlen hatásuk révén gátolták ezekben a kísérletekben a tumorok növekedését.

## V. 1. 8. Helyettesítések és acilezések kombinálása

### V. 1. 8. 1. Peptidek tervezése és előállítása

Az előző sorozat antagonistái közül több antagonista kis dózisban is nagymértékben gátolta különböző onkológiai tesztekben a tumorok növekedését. Ezek a peptidek Amp<sup>9</sup>-et tartalmaztak. A védett Amp beszerzési nehézségei és drágasága miatt a gyógyszerfejlesztés szempontjából a továbbiakban elvetettük a beépítését GH-RH antagonistákba. Négy peptid C-terminálisára beépítettük a Har<sup>28</sup>-D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>-t a korábbi D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> helyett és a korábban nagyhatású antagonistákat eredményező Tyr(Me)<sup>10</sup> helyett Tyr(Et)<sup>10</sup>-et alkalmaztunk 8 antagonistában. Argininek helyett a molekula középső részében His-t és a lizinek helyett Orn-t is alkalmaztunk. Az alábbi szekvenciában és pozíciókban végeztük a különböző helyettesítések kombinációit:

**X-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, Nle<sup>27</sup>, Y]hGH-RH(1-29)**

X = CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CO-, PhAc

R<sup>8</sup> = Asn, Ala, Cit

R<sup>9</sup> = Har, His

R<sup>10</sup> = Tyr(Me), Tyr(Et)

R<sup>11</sup> = Arg, His

R<sup>12</sup> = Lys, Orn, Har

R<sup>15</sup> = Abu, His, Cit

R<sup>20</sup> = Arg, His

R<sup>21</sup> = Lys, Orn

Y = C-terminális = D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>, Har<sup>28</sup>-D-Arg<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>

### V. 1. 8. 2. In vitro vizsgálatok

Az *in vitro* szuperfúziós vizsgálatok során a következő GH-RH antagonisták voltak a leghatásosabbak [38] és patkány hipofízisből izolált membrán preparátumhoz való kötődésük is igen magas volt, de nem érte el a legjobban kötődő peptidét (MZ-J-7-46):

#### JV-1-95

PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Har<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### MZ-J-7-118

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ala<sup>8</sup>, His<sup>9</sup>, Tyr(Et)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### MZ-J-7-138

HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CO-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ala<sup>8</sup>, His<sup>9</sup>, Tyr(Et)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Orn<sup>12</sup>, Abu<sup>15</sup>, His<sup>20</sup>, Orn<sup>21</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

#### MZ-J-7-132

PhAc-[D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Har<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, His<sup>20</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>]hGH-RH(1-29)

Az MZ-J-7-118 GH-RH antagonista antiproliferatív hatását megvizsgáltuk *in vitro* kísérletekben HEC-1A humán endometriumrák sejtvonalon. A peptid dózis-függő módon gátolta ebben az *in vitro* tesztben a sejtek proliferációját [27].

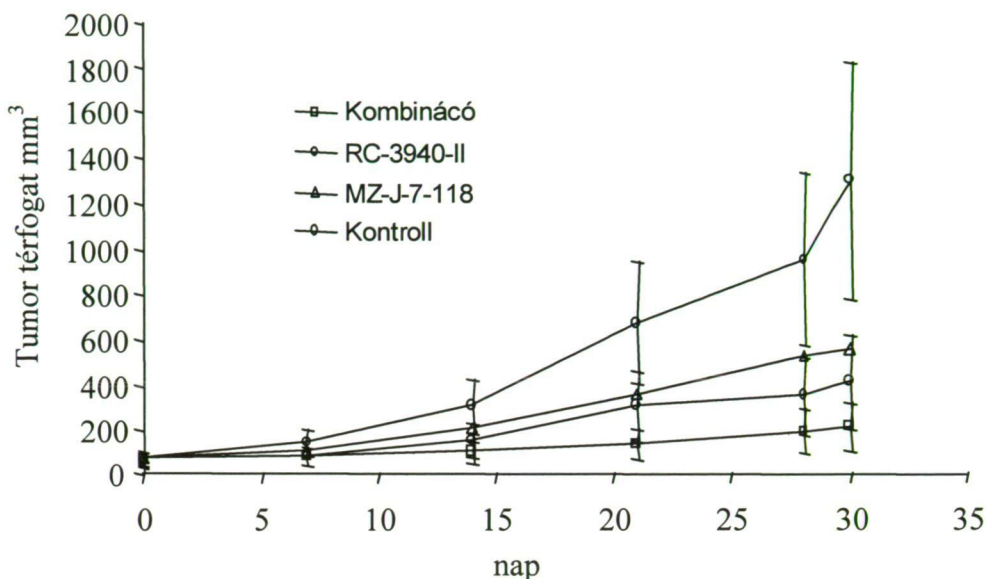
#### V. 1. 8. 3. *In vivo* vizsgálatok

Mivel a GH-RH által indukált GH felszabadulási értékek az *in vivo* vizsgálatokban már korábban sem mindig korelláltak az onkológiai eredményekkel, ezért az *in vitro* nagyhatású és jó kötődést mutató fenti peptideket csak onkológiai tesztekben vizsgáltuk meg.

#### V. 1. 8. 4. *Onkológiai vizsgálatok*

Prosztatatumoros betegekben elsősorban a metasztázisok okozzák az elhalálozást, ezért rendkívül fontos lenne a metasztatikus prosztatadaganat kezelésére alkalmas terápiás szert találni. Az immunhiányos egerek jó modellnek bizonyulnak a prosztatatumor metasztatikus viselkedésének tanulmányozására [21]. PC-3 tumorok ortotopikus és metasztatikus növekedésének gátlását MZ-J-7-118 GH-RH antagonistával (5µg/nap), egy bombesin antagonistával (10µg/nap) és a két peptid kombinációjával tanulmányoztuk. Mindhárom kezelés szignifikánsan csökkentette a tumorok növekedését, de legnagyobb mértékű csökkenést a két peptid kombinációjával tapasztaltunk: az ortotopikus növekedést

77%-kal (17. ábra) és a s.c. tumorok növekedését 86%-kal csökkentette. Az ortotopikus tumorok szomszédos szervekbe történő invázióját is a két peptiddel történő kombinált kezelés gátolta legnagyobb mértékben [39].



**17. ábra** MZ-J-7-118 GH-RH antagonista (5 µg/nap) és RC-3940-II BN/GRP antagonista (10 µg/nap) és kombinációjuk hatása a tumortérfogat növekedésére PC-3 humán androgén-független prosztatatumor esetén.

Az endometriumrák a 8. vezető halálok a nőket érintő daganatos betegségek között. Megvizsgáltuk immunhiányos egerekbe implantált HEC-1A humán endometriumrák modellen az MZ-J-7-118 antagonista hatását. A peptiddel történő kezelés hatására (10 µg/nap) szignifikánsan csökkent a tumorok növekedése a kontroll csoporthoz viszonyítva [27].

Világszerte a vezető halálok a daganatos betegek között a tüdőrák és az összes tüdőrák 75-80%-a NSCLC. A modern kemoterápiás szerek is csak az esetek 15%-ában eredményeznek 5 éves túlélést. Az MZ-J-7-138 GH-RH antagonista hatását megvizsgáltuk immunhiányos egerekbe implantált H460 humán NSCLC ortotopikus tumor modellen. A peptiddel kezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt a tüdő tumorok tömege a kísérlet végén; 10 µg/napi kezelést alkalmazva 52%-os és 20 µg/napi kezelés esetén 65%-os volt a csökkenés. Docetaxel kemoterápiás szerrel együtt adva a GH-RH antagonistát, még nagyobb mértékben csökkent a tumorok térfogata a kontrollokhoz képest. A kezelt tumorok sokkal gyorsabban nőttek, a metasztázisok száma is nagyobb volt és a kontroll

## V EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

[A szögletes zárójelben található számok a témában megjelent és mellékelt közlemények sorszámát jelzik]

### V. 1. GH-RH PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

#### V. 1. 1. GH-RH antagonisták első sorozatának előállítása és vizsgálata

##### *V. 1. 1. 1. Peptidek tervezése és előállítása*

A GH-RH antagonistá peptidek tervezésénél már rendelkezésünkre álltak az agonista analógok szerkezet-hatás összefüggései, amelyekből többé-kevésbé kiderült, hogy a natív hormon szekvenciájában mely pozíciók helyettesíthetők a biológiai aktivitás megmaradása mellett és melyek nem. Ezen kívül az irodalmi adatok alapján az ú.n. „Ala-scan” és a D-aminosav helyettesítésekkel kapott eredmények (188), valamint bizonyos fragmensek és analógok receptor affinitási adatai is rendelkezésünkre álltak. A helyettesítésekkel kapott inaktív származékok esetleges antagonistá hatásait is megvizsgálták és ezeket az eredményeket is felhasználtuk a tervezésben. Az antagonistá hatású peptidek szerkezet-hatás összefüggései különböznek ugyan az agonistákétól, de ha már van egy jó vezér vegyületünk, szisztematikus aminosav cserékkel és módosításokkal az antagonistá hatás fokozható (189, 190).

A tervezésnél elsődleges szempontunk volt, hogy a molekulának a receptor kötődésben fontos szerepet játszó helikális térszerkezetét megtartsuk, elválasszuk az intrinsic hatást a receptor kötődéstől és az új vegyületek lehetőleg enzimrezisztensek legyenek. Az irodalomban korábban leírt és hosszú ideig egyetlen antagonistát ( [N-Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Arg<sup>2</sup>]hGH-RH(1-29)-NH<sub>2</sub> ) tekintettük vizsgálatainkban standard antagonistának és az új molekulák hatásait ehhez viszonyítottuk. Az első tervezéseknél ez volt a vezér vegyületünk, ebben a peptidben a 6-os pozícióban lévő Phe-t kicseréltük (4-Cl)Phe-ra (Cpa), ez a csere *in vitro* vizsgálatainkban megnövelte a gátló hatást, ezért a Cpa<sup>6</sup>-t a később előállított antagonistákban is megtartottuk. A standard antagonistából a D-Arg<sup>2</sup>-t és az agonista analógoknál már jónak bizonyult Gly<sup>15</sup>Ala és Met<sup>28</sup>Nle cserét megtartva, az első

állatok tömege szignifikánsan csökkent (184). Az MZ-J-7-114 antagonistá immunhiányos egerekben 10 µg napi dózist alkalmazva szignifikánsan gátolta az A549 humán NSCLC tumorok növekedését is (200).

## **V. 1. 9. GH-RH és SV<sub>1</sub> receptor antigének és poliklonális antitestek előállítása**

Három haptén peptidet állítottunk elő [7], mindháromban a C-terminálisra Tyr-t építettünk be, hogy a peptid későbbi radioaktív jelzését lehetővé tegyük, valamint Cys-t, hogy az SH-csoportján keresztül kötni tudjuk a megfelelőképp módosított KLH-hoz.

A GH-RH SV<sub>1</sub> receptor extracelluláris doménjének N-terminális 1-25 aminosav szekvenciáját választottuk ki. Ebben a szekvenciában a Cys<sup>23</sup>-at Ala-nal helyettesítettük, hogy a nem kívánt oxidációt elkerüljük. Az előállított peptid ([Ala<sup>23</sup>]SV<sub>1</sub>(1-25)-Tyr-Cys-NH<sub>2</sub>) szekvenciája a következő volt:

MVPGTPSPLLGRGKELWLESLAALPYC-NH<sub>2</sub>.

Keresztreakciók tanulmányozása céljából előállítottuk a hipofízis GH-RH-R 23-45 szegmensének Ala<sup>28, 41</sup> analógját (41) ([Ala<sup>28, 41</sup>]GH-RH-R(23-45)-Tyr-Cys-NH<sub>2</sub>):

HMHPADFITQLREDESAALQAAYC-NH<sub>2</sub>.

Mivel a GH-RH-R N-terminális szakasza elleni antiszérum nem ismerheti fel a SV<sub>1</sub>-et, olyan haptén peptidet is előállítottunk, amely a GH-RH-R ([Ala<sup>112</sup>]GH-RH-R(109-130)-CysNH<sub>2</sub>) és az SV<sub>1</sub> receptor ([Ala<sup>48</sup>]SV<sub>1</sub>(45-66)-Cys-NH<sub>2</sub>) közös szekvenciájának a része:

PVAAPVPLELLAEEESYFSTVKC-NH<sub>2</sub>.

Nyulak immunizálása, majd a kapott antiszérumok tisztítása után a BSA-hoz kapcsolt haptének gyengébb immunogén tulajdonságokat mutattak, mint a KLH-hoz kötöttek. Az antiszérumokkal elvégzett vizsgálatok részletesen a [7] publikációban találhatók. A poliklonális antitestekkel immunológiaiailag detektálható volt az SV<sub>1</sub> receptor fehérje különféle tumorokban. Az SV<sub>1</sub> mRNS-e RL és HT non-Hodgkin limfóma esetén egy olyan fehérje expressziójával kapcsolatos, amely specifikusan reagált az SV<sub>1</sub> elleni antitesttel. Ez az eredmény is azt bizonyítja, hogy az SV<sub>1</sub> fehérje jelen van ezekben a tumorokban (201).

## V. 1. 10. GH-RH antagonisták tumornövekedést gátló hatásának mechanizmusa

A GH-RH-t először pankreáštumorból izolálták, tehát több mint 2 évtizede ismert, hogy egyes rákos szövetek GH-RH-t termelnek és igazolták az IGF-I mitogén hatását különböző daganatos betegségekben (202). Vizsgálataink azt bizonyították, hogy a prosztata-, vese- és tüdőrák, valamint csonttumorfok növekedésének GH-RH antagonista kezelés hatására bekövetkező csökkenése a szérumban és májban IGF-I szintek csökkenésével kapcsolatos (47, 48, 193), [2, 3]. Ezek az eredmények az indirekt, endokrin mechanizmust igazolják, azaz a hipofízisben a GH felszabadulás gátlása révén az antagonista peptidek csökkentik az IGF-I szintet a szérumban és az IGF-I termelődését a májban.

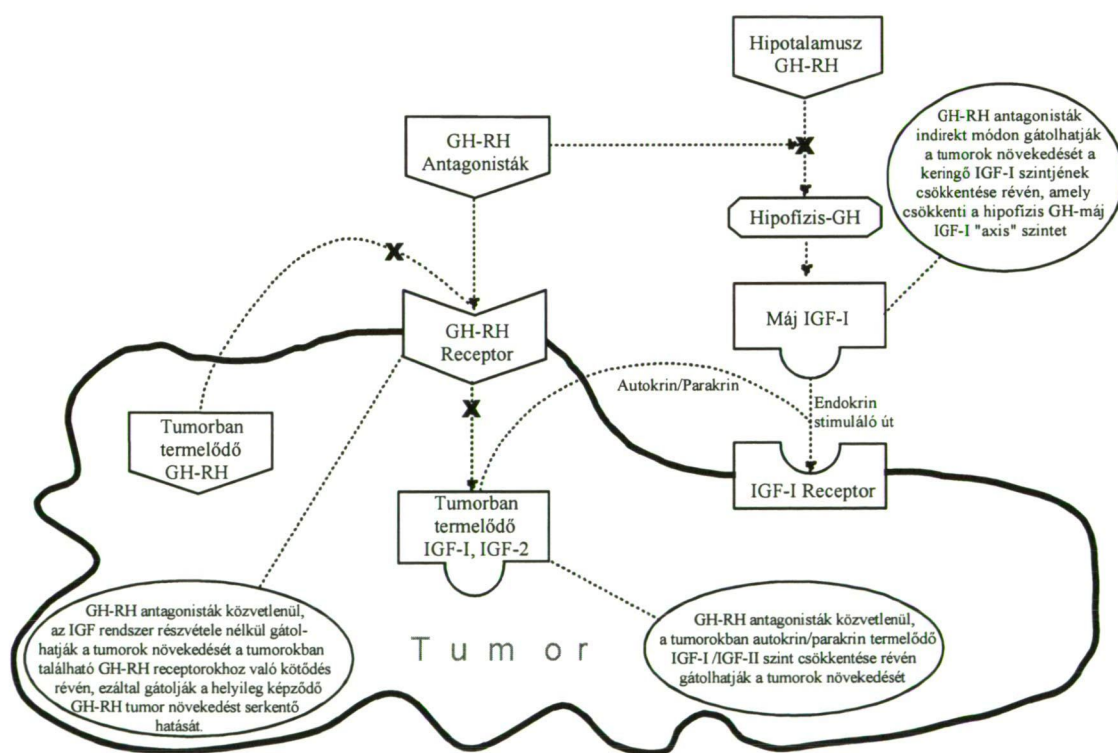
A szérumban csökkent IGF-I szint azonban nem magyarázza azt, hogy a GH-RH antagonisták hatásosan gátolják tumorokban az IGF-II termelődést olyan esetekben is, amelyek függetlenek a GH-tól (203). Újabb kutatások igazolták, hogy a GH-RH autokrin/parakrin növekedési faktor több malignus folyamatban (204). Bizonyos daganattípusok esetén, mint pl. pankreász-, vastagbél-, emlő-, ovárium- és bizonyos prosztata- és tüdőrák esetén a GH-RH antagonisták anélkül gátolták a tumorok növekedését, hogy a szérumban IGF-I szint változott volna (49, 50, 183) [23]. Ezek az eredmények arra a következtetésre vezettek, hogy a GH-RH antagonisták tumornövekedést gátló hatásának elsődleges mechanizmusa a korábbi feltételezésekkel szemben a tumorszövetekre kifejtett közvetlen hatásukkal kapcsolatos (205) [19]. Azt is megfigyeltük, hogy GH-RH antagonisták képesek voltak gátolni különböző tumorsejtek proliferációját *in vitro*, ez is csak közvetlen hatással lehetséges, mivel ebben az esetben a hipotalamikusan GH-RH → hipofízis GH → máj IGF-I út kizárható (46, 49-51, 57, 196, 197, 205) [23]. Tehát a GH-RH antagonisták tumornövekedést gátló hatásának közvetlen mechanizmusa a helyileg termelődő GH-RH autokrin/parakrin hatásának a gátlása révén a tumorok IGF-II termelésének csökkentésével kapcsolatos.

Számos daganatos sejtvonal termel GH-RH-t és a növekedésüket az exogén GH-RH agonisták fokozzák. A GH-RH mRNS-ét sikerült kimutatni műtéti eljárással eltávolított humán petefészek, endometrium, emlő és prosztata tumorszövetből is (44, 56, 206). A GH-RH receptor 4 splice variánsát és specifikus, nagy affinitású, GH-RH-t és antagonistáit kötő fehérjéket kódoló mRNS-eket is kimutattak daganatos betegekből eltávolított tumorokban (55, 57, 196, 207). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a GH-RH antagonisták direkt



antiproliferatív hatásukat a GH-RH és a tumorban lévő receptorain keresztül az autokrin/parakrin út blokkolásán keresztül fejtik ki (49, 208).

A GH-RH antagonisták direkt és indirekt módon csökkentik a tumorok növekedését. A gátló hatás mechanizmusát a **18. ábra** (30) foglalja össze sematikusan. Az indirekt hatás az endokrin GH-RH → GH → IGF-I kapcsolat gátlásán alapul: a GH-RH antagonisták a hipofízisben a GH-RH-nak a receptorhoz való kötődés gátlása révén megakadályozzák a GH felszabadulását. Ez a szérumban az IGF-I szintjének csökkentése révén, valamint a májban az IGF-I termelés csökkentése révén a tumorok növekedésének gátlásához vezet (49, 209). A GH-RH antagonisták direkt hatás révén is gátolhatják a tumorokban termelődő autokrin/endokrin GH-RH-nak a tumorokon lévő receptorhoz való kötődését. Ez közvetlenül gátolhatja a tumor növekedését azáltal, hogy csökkenti az IGF-I és IGF-II autokrin/parakrin termelődését a tumorban, de a gátlás IGF-től független is lehet [27].



**18. ábra** A GH-RH antagonisták tumornövekedést gátló hatásának mechanizmusa.

## V. 2. A $\beta$ (1-42) ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

[A kis betűvel jelölt aminosavak minden esetben D-aminosavat, a peptid C-terminálisán alsó indexbe írt „a” betű pedig savamid csoportot jelent].

### V. 2. 1. Szintézis

A különböző biológiai vizsgálatok céljára nagy mennyiségű és kielégítő tisztaságú A $\beta$ (1-42)-re volt szükségünk. A peptidben található sok hidrofób aminosav miatt az A $\beta$ (1-42) ú.n. nehéz szekvencia, a szintézis során ugyanis a hordozón épülő peptidláncok könnyen egymáshoz csapódnak, a láncok egymás között vagy láncon belül aggregálódnak és ez mind a deprotektálás, mind a kapcsolás szempontjából nehezen hozzáférhetővé teszi az N-terminális amino-csoportot. Ennek eredményeként halmozottan előfordul a nem tökéletes védőcsoport eltávolítás és kapcsolás, amely nehézkessé teszi a szintézist és a nyers termék számos hibás szekvenciát tartalmaz.

Az A $\beta$ (1-42) első szintézise óta számos próbálkozás történt a problémákat okozó aggregáció kiküszöbölésére, mint pl. speciális védőcsoportok alkalmazása, pseudoprolin dipeptid blokkok beépítése, nagyon hatékony kapcsoló reagensek alkalmazása, vagy a gyantán növekvő peptidlánc szolvatációjának növelése különleges oldószerekkel vagy ú.n. chaotróp oldószer elegyekkel. Ezeknek a módszereknek egyike sem oldotta meg tökéletesen a szintézis problémáit.

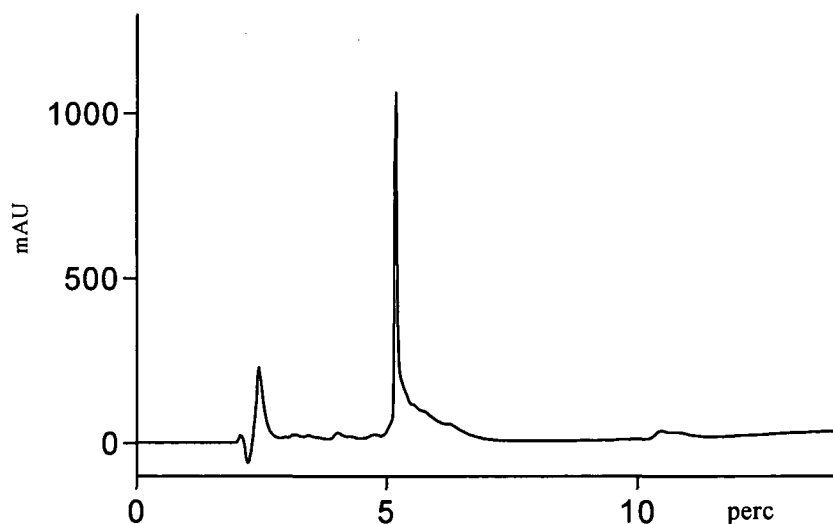
A fenti problémák elkerülésére kidolgoztuk az A $\beta$ (1-42) racionális szintézisét Fmoc-stratégiával [8]. A növekvő, oldallánc védelemmel ellátott peptid aggregációjának megakadályozására anizolt, egy speciális szolvatáló reagenst alkalmaztunk. Közvetlenül a kapcsolások előtt oldottuk fel a védett aminosavakat 1-2 ml DMF-ben és ezt az oldatot 10% anizolt tartalmazó 10 ml DCM-nal hígítottuk. A Wang gyanta duzzadása az anizol/DMF/DCM oldószer elegyben összemérhető a DCM-ban tapasztalt duzzadással. Az anizol koncentrációját 20-30%-ra növelve nem javult sem a Wang gyanta duzzadása, sem az acilezés mértéke, viszont nagyobb koncentrációjú anizol alkalmazása csökkentette néhány N<sup>α</sup>-Fmoc-csoporttal védett aminosav oldhatóságát. Lényegesen kevesebb esetben kellett a kapcsolást megismételni, mint az anizol nélküli szintézisek esetén és csak néhány esetben

kellett háromszor kapcsolni. Az ismételt kapcsolásokat HBTU-val végeztük. A **18. ábra** bemutatja az A $\beta$ (1-42) szekvenciáját, valamint a kétszer ill. háromszor megismételt kapcsolásokat.

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

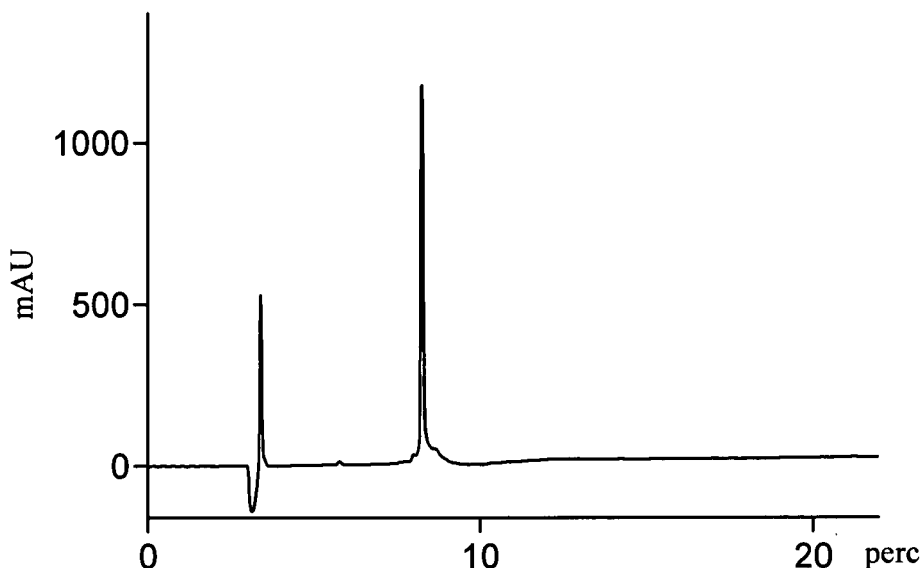
**18. ábra** Az A $\beta$ (1-42) szekvenciája. A vastag betűs jelölés dupla, a vastag betű és aláhúzás háromszoros kapcsolást jelent.

Az A $\beta$ (1-42) peptidnek a hordozón bekövetkező aggregációját a 10% anizolt tartalmazó DMF/DCM oldószer elegy alkalmazásával sikerült megakadályoznunk. A nyers termék HPLC kromatogramján nem található oxidált termékre utaló csúcs (**19. ábra**). A korábbi szintézisek nyers termékeihez képest viszonylag nagytisztaságú termék annak az eredménye, hogy a szintézis során a 10% anizol megakadályozta a peptid aggregációját a gyantán, valószínű az Fmoc-csoporttal és oldallánc védőcsoportokkal létesített aromás-aromás kölcsönhatások miatt.



**19. ábra** Az Fmoc-szintézissel és az oldószerekben 10% anizol alkalmazásával előállított A $\beta$ (1-42) nyers termék analitikai RP-HPLC kromatogramja (C<sub>4</sub> oszlop; gradiens elúció, 30-70% B).

A nyerstermék aggregációjának megelőzésére előzetes liofilizálás nélkül, azonnal tisztítottuk a peptidet. RP-HPLC tisztítás után a termék >95% tisztaságú volt (20. ábra), liofilizálás után a fehér, laza szerkezetű anyag a neurotoxicitásának csökkenése nélkül -20 °C-on hónapokig eltartható (vízoldható, protofibrilláris állapotban).



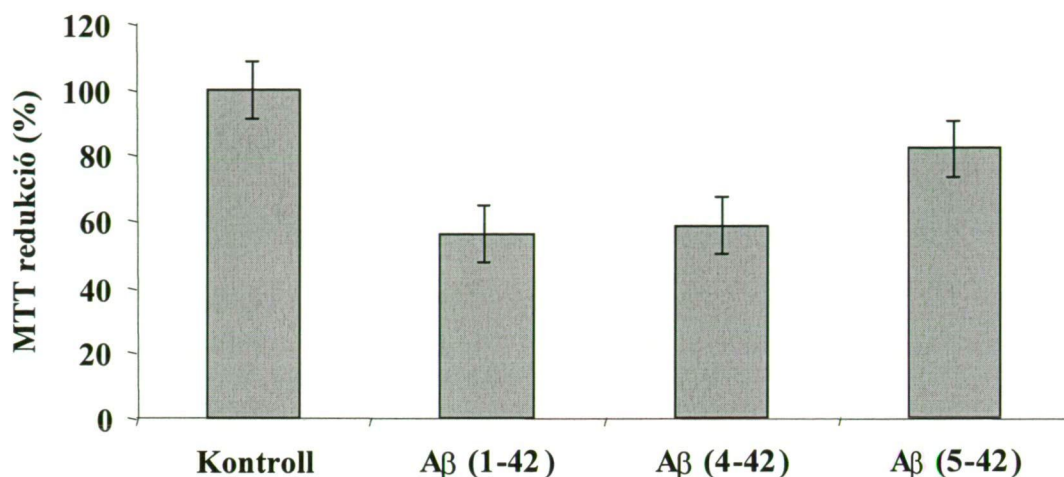
**20. ábra** A megtisztított A $\beta$ (1-42) analitikai RP-HPLC kromatogramja (C<sub>4</sub> oszlop; gradiens elúció, 30-90% B).

A DMF/DCM oldószer elegyben alkalmazott 10% anizol optimális kapcsolási körülményeket biztosított a szintézis során, ezáltal növelte a nyers A $\beta$ (1-42) tisztaságát és a termelést. Mivel az anizol rendkívül olcsó vegyület, az ú.n. nehéz szekvenciájú peptidek szintézisének alkalmas az aggregáció megakadályozására.

## V. 2. 2. MTT teszt

Az A $\beta$ (1-42) fenti előállításához hasonlóan 10% anizol alkalmazásával előállítottuk biológiai kísérletek céljára az N-terminálison rövidített két fragmensét is az A $\beta$ (4-42) és A $\beta$ [5-42] peptideket [8]. MTT tesztben megvizsgáltuk a neurotoxicitásukat differenciált SH-SY5Y humán neuroblastoma sejteken. Az SH-SY5Y neuroblastoma sejtvonal jól jellemzett humán eredetű sejtvonal, sejtkultúrában gyorsan növekszik a sejtszám és a receptorok és ioncsatornák vonatkozásában nagy a hasonlóság az érett neuronokkal, ezért alkalmas neurotoxikus vegyületek vizsgálatára. Az MTT vizsgálatok szerint [8] az A $\beta$ (1-42) 54-62%-ra csökkenti a vizsgált, differenciált SH-SY5Y humán

neuroblastoma sejtek viabilitását, a két fragmens közül az A $\beta$ (4-42) neurotoxicitása ezt megközelítette, de egyik származéké sem érte el az A $\beta$ (1-42) toxikus hatását (**21. ábra**).



**21. ábra** A $\beta$ (1-42), A $\beta$ (4-42) és A $\beta$ (5-42) neurotoxikus hatása az MTT tesztben differenciált humán neuroblastoma sejteken (SH-SY5Y). A vizsgált sejtek életképessége a kezeletlen kontroll %-ában van kifejezve.

A Boc-protokoll alkalmazásával előállított A $\beta$ (1-40)<sub>a</sub> és a fordított szekvenciájú A $\beta$ (42-1), csupa-D A $\beta$ (1-40)<sub>a</sub>, A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (35-25), A $\beta$ (25-35)<sub>a</sub> és A $\beta$ (35-25)<sub>a</sub> neurotoxicitását is megvizsgáltuk MTT tesztel és azt találtuk, hogy a csupa-D A $\beta$ (1-40)<sub>a</sub> az A $\beta$ (1-42)-höz hasonló neurotoxicitást mutatott, a többi vegyület kevésbé volt neurotoxikus [40].

### V. 2. 3. Sejten belüli Ca<sup>2+</sup> mérése/Fluoreszcencia mérések

Patkány astroglia sejtenyészen is megvizsgáltuk az A $\beta$ (1-42) hatását. A kezelt és a kezeletlen kontroll sejteket Ca<sup>2+</sup>-érzékeny Fura-2 festékkel jelöltük és 495 nm emissziós hullámhosszon spektro-fluoriméterrel megmértük a fényintenzitást 340 és 380 nm-en történő gerjesztésnél. Mivel a 367 nm hullámhossz nem érzékeny a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> szintre, az állandó állapotú fluoreszcencia fényintenzitását 367 nm-es gerjesztésnél mértük. Az A $\beta$ (1-42) kezelés szignifikánsan megemelte a 340/380 nm-en történő gerjesztésnél a mért fluoreszcencia fényintenzitás arányát (**5. táblázat**). A Ca<sup>2+</sup>-ra nem érzékeny 367 nm-es

gerjesztés esetén nem volt detektálható szignifikáns fluoreszcencia változás [9]. Ez azt jelzi, hogy az A $\beta$ (1-42) kezelés hatására bekövetkező fluoreszcencia emelkedés valóban a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> szint megemelkedéséből adódott

	Fluoreszcencia gerjesztés 340/380 nm aránya	Fluoreszcencia gerjesztés 367 nm
<b>Kontroll</b>	1.25 $\pm$ 0.06	355 $\pm$ 18
<b>A<math>\beta</math>(1-42)</b>	1.39 $\pm$ 0.05	367 $\pm$ 21

**5. táblázat** A $\beta$ (1-42) peptid hatása a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> szintre astroglia sejtenyészeten. A fluoreszcencia gerjesztés aránya 340/380 nm-en és az állandó állapotú fluoreszcencia 367 nm-en spektro-fluoriméterrel 495 nm emissziós hullámhossznál mérve a fényintenzitást.

Ezekben a kísérletekben az A $\beta$ (1-42) rövidebb fragmenseit A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (31-35) is megvizsgáltuk. Mivel a fluorimetriás mérések eredményei szerint mindegyik peptid hasonló sejtválaszt indukált, ebből arra következtettünk, hogy az A $\beta$ (31-35) régió, hasonlóan a peptidhormonokhoz, az A $\beta$  aktív centruma lehet, ezért az első, neuroprotektív peptideket ebben a régióban terveztük.

## V. 2. 4. Aggregációs vizsgálatok

Az A $\beta$  peptidek vizsgálata nagy kihívást jelent, mert az oldatukban adott körülmények között lejátszódó aggregációs folyamatok iránya és végeredménye nem mindig jósolható meg előre. A biológiai vizsgálatok előtt sok esetben valamilyen előkezelés történik, pl. sejt kultúra médiumban történő, hosszabb ideig tartó inkubálás, vortex használata vagy ultraszonikálás, amelyek mind befolyásolják az aggregációt. A kereskedelembe kapható és a saját szintézissel nyert peptidek is minden esetben tartalmaznak ismeretlen szerkezetű aggregátumokat, amelyek a feloldást megnehezítik. Egy adott minta toxicitása nagymértékben függ a különböző toxikus aggregátumok arányától, ezért nagyon fontos lenne az A $\beta$  peptidek aggregációjának a standardizálása, de ez nem

könnyű feladat. A standardizálás általánosságban a következő lépések valamelyikét jelenti: 1) dezaggregálás erős, chaotróp oldószerekkel (pl. DMSO, TFA, HFIP); 2) az oldószer eltávolítása vagy az oldat hígítása; 3) a peptid ismételt oldása vizes médiumban; 4) ultraszonikálás; 5) a minta beoltása előre előállított fibrillumokkal, hogy az A $\beta$  peptidek aggregációját elindítsuk. A biológiai vizsgálatok szempontjából döntő fontosságú a fenti lépések közül a legmegfelelőbb kiválasztása, mert pl. a dezaggregálásra alkalmazott különféle oldószerek különböző aggregációs profilok, konformációk kialakulását segítik elő [16].

A toxicitás és aggregáció közötti kölcsönhatást A $\beta$  peptideknél TEM, DLS és FT-IR módszerekkel vizsgáltuk *in vitro*, valamint elektrofiziológiai kísérletekkel *in vivo* is tanulmányoztuk. Azt tapasztaltuk, hogy az összes vizsgált peptid szolvatált monomer formában van DMSO vagy HFIP oldatokban 20 mg/ml koncentrációban is. Az aggregáció szekvencia függő, az A $\beta$ (1-42) aggregálódik leggyorsabban, már 1 napig tartó ú.n. „öregítés” 20 °C-on csaknem teljes aggregációt eredményez. Az aggregáció elkezdődéséhez a kritikus koncentráció  $2-5 \times 10^{-5}$  M vizes oldatban és konformációváltozásra is szükség van:  $\alpha$ -hélixes/rendezetlen szerkezetből  $\beta$ -redőzött szerkezetbe való átalakulásra [41].

#### ***V. 2. 4. 1. TEM vizsgálatok***

Három, különböző előkezelés után megvizsgáltunk az A $\beta$ (1-42) minták aggregációját TEM-mel és neurotoxicitásukat MTT-vel. A minta 1) nem volt öregítve, 2) 7 napig volt öregítve, 3) nem volt öregítve, de a vizsgálat előtt a deszt. vizes oldatot kétszer liofilizáltuk. Az MTT tesztben az SH-SY5Y sejtek életképessége szignifikánsan csökkent mindhárom esetben, legnagyobb mértékben a harmadik, vagyis a 2-szer liofilizált minta csökkentette a viabilitást, tehát ez volt a legtoxikusabb. A TEM vizsgálatokban különbözőképp aggregálódott a három minta. Az első mintában csak rövid, flexibilis protofibrillumokat és aggregációs góciókat („nucleation center”) találtunk, a másodikban hosszú, érett fibrillumok voltak jelen protofibrillumokkal együtt. A harmadik minta nagy mikroaggregátumokat tartalmazott, amelyekből viszonylag rövid idő alatt fibrillumok keletkeztek. Ezekben a kísérletekben is korellált az aggregáció mértéke az MTT-teszttel mért neurotoxicitással [42].

#### ***V. 2. 4. 2. Dinamikus fényszóródás mérés (DLS)***

Az oldószereknek az A $\beta$ (1-42) aggregációjára kifejtett hatását DLS vizsgálatokkal TFA, DMSO és HFIP oldószerekben készített, viszonylag nagy koncentrációjú (1.0 mM)



mintákkal végeztük [16], amelyeket a vizsgálatok előtti vizes hígításig lefagyaszttva tároltunk. A DLS eredmények alapján egyik vizsgált oldószer sem volt képes teljes mértékben dezaggregálni a peptid aggregátumokat 1.0 mM koncentrációjú oldatokban. A DMSO és HFIP oldatokban a peptid 50-1000 nm méretű asszociátumokat képezett. Mindkét oldószerben a görbének 2 maximuma volt, az egyik a protofibrillumok, a másik a fibrillumok mérettartományában. Annak ellenére, hogy a HFIP nem képes teljes mértékben monomereket létrehozni az A $\beta$ (1-42) oldatában, feltételezhetően elősegíti a peptidlánc  $\alpha$ -hélixes és rendezetlen szerkezetének a kialakulását, amelyek a  $\beta$ -redőzött sík szerkezetű elemekkel a megfigyelt szabálytalan alakú szerkezetek kialakulását eredményezheti és ezek hozzák létre az aggregátumok nagymértékű szerkezeti rendezetlenségét. Monomerek, dimerek és kis oligomerek jelenlétét csak TFA oldatban tudtuk detektálni [16]. Ennek ellenére a TFA-ban történő oldás nem alkalmas a biológiai mérésekhez szükséges minták elkészítésére, mert nem lehet egyszerűen hígítani: a hígított oldat ugyanis túlságosan savas kémhatású lesz vagy pufferrel történő hígítás esetén a trifluoracetát ionok az oldat ionerősségét nem kívánt mértékben eltolják, ezen kívül víz hozzáadására azonnal megindul az aggregáció.

#### V. 2. 4. 3. FT-IR vizsgálatok

Az A $\beta$  peptidek az előre elkészített oldatokban monomerként, DMSO-ban szolvatált rendezetlen formában (esetleg kevés  $\alpha$ -hélixes szerkezet) és HFIP-ben  $\alpha$ -hélixes szerkezetben találhatók. A DMSO-oldatok könnyebben standardizálhatók, mivel a HFIP-vel ellentétben a DMSO nem illékony. A mérések előtti PBSA-val történő hígítás után azonnal megindul az addig rendezetlen A $\beta$ (1-42) rendeződése  $\beta$ -szerkezetűvé és megindul az aggregáció is. Az A $\beta$ (1-42) 2D FT-IR spektrumokban talált 1689 cm<sup>-1</sup> sáv az antiparallel  $\beta$ -szerkezet magas hullámhosszú komponensének tekinthető. Hasonló konformációs viszonyokat mutatott az A $\beta$ (1-40) peptid is, de az aggregációs tendencia kevésbé volt kifejezett a C-terminálison két aminosavval rövidebb molekula esetén. Huszonnégy órás 2D FT-IR vizsgálatok azt mutatták, hogy a hélixes szerkezetből  $\beta$ -szerkezetbe történő átalakulás lényegesen lassúbb, mint a  $\beta$ -szerkezetből rendezettebb  $\beta$ -szerkezetbe való átalakulás, amely az aggregáció különböző állapotaihoz vezet. A lassabb átalakulás az  $\alpha$ -hélixes szerkezeten belüli H-kötésekkel magyarázható. Az FT-IR spektroszkópia alkalmas módszer a peptidek aggregációs készségének tanulmányozására [15].

Az A $\beta$ (1-42) két módosított származékát is előállítottuk: a MOD-3 analógban megtartottuk a feltételezett toxikus pentapeptid (31-35) szekvenciáját, az összes többi





hidrofób aminosavat hidrofilre cseréltük, a MOD-4 analógban pedig a (31-35) szekvenciárész aminosavait Ala-nal helyettesítettük, a molekula többi része változatlan maradt [41]. A hidrofil MOD-3 peptid nem aggregálódik, vagy extrém lassú az aggregáció és ezért nem toxikus, míg a hidrofób MOD-4 a  $\beta$ -szerkezete miatt aggregálódik és toxikus [43]. A fordított szekvenciájú A $\beta$ (42-1) nem mutat  $\beta$ -redőzött szerkezetet, csak nagyon kismértékben aggregálódik, ezért csak minimális neurotoxicitást mutat az MTT tesztben [44].

## V. 2. 5. Stabilitás vizsgálatok

Irodalmi adatok arra utaltak (210), hogy az A $\beta$ (1-42) neurotoxicitásáért a (25-35) szekvencia a felelős. Biológia vizsgálataink előtt „öregítettük” az általunk előállított A $\beta$ (25-35) peptidet, hogy elősegítsük az aggregátumok képződését. Az „öregítés” több napig tartó folyamat, ezért megvizsgáltuk az A $\beta$ (25-35) stabilitását az alkalmazott körülmények között [17]. A különböző hosszú inkubálás után a RP-HPLC kromatogramok azt mutatták, hogy 1) deszt. vízben pH=7-nél még 5 nap után sem történt lebomlás; 2) puffer oldatban pH=7.4-nél 19 óra múlva megjelenik a (28-35) szekvenciájú bomlástermék és 4 nap múlva a peptidnek több mint 50%-a elbomlott; 3) pH=8-on Ca<sup>2+</sup> ionok jelenlétében sokkal gyorsabb volt a bomlás, mint Ca<sup>2+</sup> ionok jelenléte nélkül [45]. Vizsgálatunk azt bizonyította, hogy az A $\beta$ (25-35) elsődleges lebomlása vizes oldatokban az Asp<sup>27</sup> után történő hasadás [17].

## V. 2. 6. Fluoreszcens-jelölt peptidek előállítása

Aminosavak, peptidek és fehérjék szintézis utáni módosításai között gyakori az oldatfázisban történő FITC-jelölés. Mivel az A $\beta$  peptidek feloldása problematikus, az oldatfázisú FITC-jelölés A $\beta$  és más hidrofób peptideknél nincs megoldva. Az A $\beta$ (25-35) N-terminálison történő jelölésekor a Lys<sup>28</sup> oldalláncának védőcsoportot kell tartalmaznia (pl. Boc-szintézis esetén Fmoc-védőcsoportot), amely tovább növeli a molekula hidrofób jellegét és aggregációs készségét. Az oldékonysági problémák miatt az oldatfázisú kapcsolásnál általánosan használt puffer helyett DMSO-ban végeztük a FITC kapcsolását [46].

A még hordozón lévő, oldallánc védőcsoportokat tartalmazó A $\beta$ (1-42)-t és A $\beta$ (25-35)-t AMCA jelöléssel láttuk el. Ebben az esetben maga a jelölő vegyület kapcsolása HATU reagenssel nem jelentett problémát, viszont a hordozóról történő, a Fmoc-szintézisnél általánosan alkalmazott hasítás során minden esetben Met-szulfoxidot tartalmazó terméket kaptunk, amelynek a visszaredukálása nem volt sikeres. Az irodalomból ismert (211) hasító koktélt módosítva (81% TFA, 5% fenol, 5% tioanizol, 3% H<sub>2</sub>O, 2.5% DTT, 2% DMS és 1.5% NH<sub>4</sub>I) sikerült Met-szulfoxid-mentes terméket kapnunk [11]. Az A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) és az LPFFD molekulák fluoreszcens jelölését FAM-mal is elvégeztük a hordozón lévő, oldallánc védelemmel még ellátott peptideken. A Met-t tartalmazó A $\beta$ (25-35)-t és A $\beta$ (1-40)-et a fenti hasító reagenssel hasítva le a hordozóról Met-szulfoxid nélküli terméket kaptunk [11].

## V. 3. NEUROPROTEKTÍV PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

### V. 3. 1. Funkcionális antagonisták

Mivel a fluorimetriás mérések azt mutatták, hogy az A $\beta$ (31-35) is neurotoxikus, az első potenciálisan neuroprotektív hatású peptidek sorozatában az A $\beta$ (31-35) szekvenciát tekintettük a tervezés alapjának. Az első sorozatban előállított nyolc peptid közül a Pr-Ile-Ile-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> (Pr-IIGL<sub>a</sub>) *in vitro* kísérletekben astroglia sejtenyészeten gátolta az A $\beta$  neurotoxikus hatását [9]. Ebben a szekvenciában szisztematikusan kicseréltük az aminosavakat L- és D-Ala-ra. SH-SY5Y humán neuroblastoma sejteken végzett életképességi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy L-Ala helyettesítéseket végezve a molekulában, a Leu<sup>34</sup>Ala cserét kivéve minden esetben csökkent a neuroprotektív hatás, Ile<sup>32</sup>Ala csere esetén teljesen meg is szűnt [13]. D-Ala helyettesítések esetén viszont a Leu<sup>34</sup>D-Ala helyettesítés kivételével minden esetben nőtt a neuroprotektív hatás. Hím patkányok agyába (magnocelluláris nucleus basalis) mikrodialízissel bejuttatva az A $\beta$ (1-42) és Pr-IIGL<sub>a</sub> peptideket azt tapasztaltuk, hogy a Pr-IIGL<sub>a</sub> kivédte az A $\beta$ (1-42)-nek a kolinerg neuronokra kifejtett excitotoxikus hatását. Patkányokkal végzett viselkedési tesztekben is

védő hatású volt a Pr-IIIGL<sub>a</sub>. Ezekkel a kísérletekkel *in vivo* is sikerült igazolnunk a Pr-IIIGL<sub>a</sub> idegsejteket védő hatását [28]. A Pr-IIIGL<sub>a</sub> peptidet a Bachem GmbH 1998-ben felvette a terméklistájára és azóta is forgalmazza, mint az első olyan A $\beta$  fragmenst, amely képes gátolni az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatását.

A Pr-IIIGL<sub>a</sub> oldhatóságának növelése céljából beépítettünk egy Arg-t a molekulába. Ez a módosítás nemcsak a vízben való oldhatóságot, hanem a neuroprotektív hatást is megnövelte [47]. A Pr-RIIGL<sub>a</sub> peptidnek a G-fehérje aktiválásra kifejtett hatását megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy teljes mértékben gátolta az A $\beta$ (1-42) által indukált GTP kötődést és a bazális G-fehérje aktivitást [48]. A fenti eredmények alapján a Pr-RIIGL<sub>a</sub> molekulát funkcionális antagonistá vegyületnek tekintettük [47].

FT-IR mérések során A $\beta$ (1-42)-t Pr-IIIGL<sub>a</sub> és RIIGL<sub>a</sub> peptidek (az A $\beta$ (31-34) származékai) oldataival 1:3 mólarányban összekeverve azt tapasztaltuk, hogy a  $\beta$ -szerkezeti elemek aránya csökkent és magasabb hullámszámok felé tolódott el a spektrum, ami a gyengébb asszociációt jelzi [49]. Ez az eredmény összhangban volt a fenti származékok neuroprotektív hatásával. Az A $\beta$ (35-31) reverz szekvencia 2D FT-IR vizsgálata érdekes módon a  $\beta$ -szerkezet növekedését mutatta [50].

Korábbi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az A $\beta$ (1-42) a nyugalmi transzmembrán potenciál korai hiperpolarizációját okozza neuron sejtenyészeten. Humán striatumból származó neuron sejtenyészeten megvizsgáltuk a Pr-IIIGL<sub>a</sub> és L-Ala szubsztituált származékait arra keresve választ, hogy ezeknek a rövid peptideknek van-e rövid távú hatásuk az idegsejtekre. Az idegsejteknek a transzmembrán potenciálra érzékeny DiBAC<sub>4</sub> festékkel, majd a peptidekkel történő kezelése után vizsgáltuk a nyugalmi transzmembrán potenciált. Mivel a festék lipofil anion, a sejtekben való koncentrációja fordítva arányos a nyugalmi transzmembrán potenciállal, azaz a sejtek festék-felvételének csökkenése viszonylag magasabb membránpotenciálra utal. Az A $\beta$ (1-42) a fluoreszcencia intenzitását csökkentette, ez hiperpolarizációra utal. Várakozásunkkal ellentétben a Pr-IIIGL<sub>a</sub> is enyhe fluoreszcencia intenzitás csökkenést okozott, de ez jóval kisebb mértékű volt, mint A $\beta$ (1-42) esetén. Az L-Ala-nal szubsztituált származékok egyike sem indukált hiperpolarizációt. Ezek a kísérleti eredmények azt mutatták, hogy Pr-IIIGL<sub>a</sub> molekulában bármelyik aminosav cseréje L-Ala-ra a hiperpolarizációt indukáló hatás elvesztésével jár együtt [13].

Ebben az időben még nem állt rendelkezésünkre olyan módszer, amellyel az előállított peptidek hatásáról gyorsan információt kaphattunk volna: a sejtszámláláson alapuló életképességi mérések nem voltak elég pontosak, a fluorimetriás mérések pedig

nehézkességük miatt nem alkalmasak nagyszámú peptid gyors tesztelésére. Az előállított rövid peptidek neuroprotektív hatásáról később, az MTT teszt bevezetésével gyors és megbízható visszajelzéseket kaptunk, amelyre szükségünk volt a további tervezésekhez. Az SH-SY5Y humán neuroblasztoma sejteket a vizsgált peptiddel egyedül és A $\beta$ (1-42)-vel együtt kezeltük. Az előállított, potenciálisan neuroprotektív, rövid peptidek egy része az MTT tesztben önmaga is neurotoxikus volt, de A $\beta$ -val és a rövid peptidekkel együtt kezelve a sejteket, az önmagában neurotoxikus vegyületek némelyike is képes volt kivédeni az A $\beta$  neurotoxikus hatását.

A korábban előállított és biológiai tesztekben hatásos Pr-RIIGL<sub>a</sub> peptid alapján terveztük és állítottuk elő az alábbi új pentapeptideket, amelyek előzetes feltételezésünk szerint gátolhatják az A $\beta$ [1-42] neurotoxikus hatását. A peptidekbe D-konfigurációjú, valamint néhány nem természetes aminosavat is beépítettünk az enzimrezisztencia fokozása céljából.

1) Szabad N-terminálisú és karboxamid C-terminálisú peptidek:

RIIGL<sub>a</sub>, DIIGL<sub>a</sub>, KIIGL<sub>a</sub>, Riigl<sub>a</sub>, lgiir<sub>a</sub> (retro), Gaba-IIIGL<sub>a</sub>,

RIIPL<sub>a</sub>, rIIPL<sub>a</sub>, RII(NMe)GL<sub>a</sub>, RVVGV<sub>a</sub>, RGGGG<sub>a</sub>

2) Acilezett N-terminálisú és karboxamid C-terminálisú peptidek:

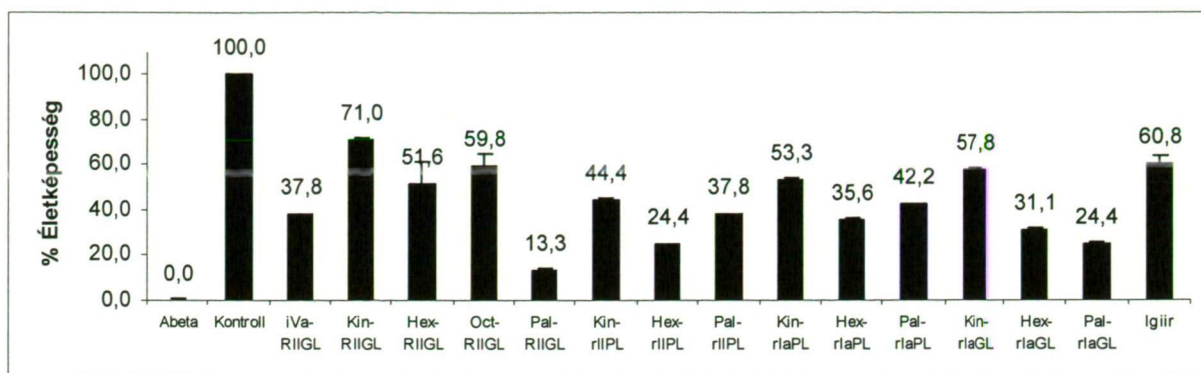
Ac-RIIGL<sub>a</sub>, Pr-RIIGL<sub>a</sub>, Hex-RIIGL<sub>a</sub>, Oct-RIIGL<sub>a</sub>, Dec-RIIGL<sub>a</sub>, Mir-RIIGL<sub>a</sub>, Pal-RIIGL<sub>a</sub>, PhPr-RIIGL<sub>a</sub>, Kyn-RIIGL<sub>a</sub>, Nic-RIIGL<sub>a</sub>, iVa-RIIGL<sub>a</sub>,

Pr-RIIPL, Pr-rIIPL, Kyn-rIIPL, Hex-rIIPL, Pal-rIIPL

Kyn-rIaPL, Hex-rIaPL, Pal-rIaPL, Kyn-rIaGL, Hex-rIaGL, Pal-rIaGL

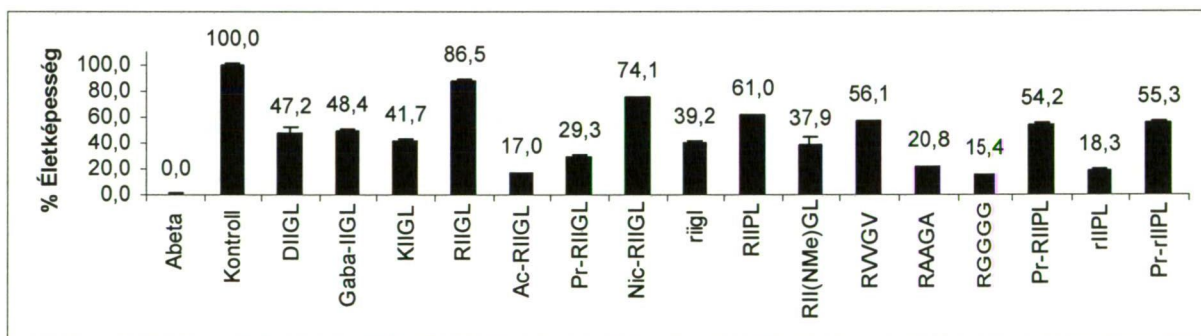
(Hex = hexanoil, Oct = oktanoil, Dec = dekanoil, Mir = mirisztoil, PhPr = fenilpropionil, Kyn = kinurenil, Nic = nikotinil, iVa = izovaleril, Nal = 2-naftil-Ala)

A 22. ábra annak a 15 acilezett pentapeptidnek az MTT tesztben, differenciált SH-SY5Y humán neuroblastoma sejtek életképességére kifejtett eredményeit mutatja be, amelyek önmagukban neurotoxikusak voltak: iVa-, Kin-, Hex-, Oct-, Pal-RIIGL<sub>a</sub>; Kin-, Hex- és Pal-rIIPL<sub>a</sub>; Kin-, Hex- és Pal-rIaPL<sub>a</sub>; Kin-, Hex- és Pal-rIaGL<sub>a</sub>; lgiir<sub>a</sub>. A 80% fölötti életképesség értéket mutató molekulákat tekintettük nem toxikusnak. Az összes életképesség % értékek szignifikánsan különböztek mind a kontroll, mind az A $\beta$ (1-42) értékeitől.



**22. ábra** Az önmagukban neurotoxikus peptidek differenciált SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteken mutatott életképességi eredményei MTT tesztben.

A **23. ábra** azoknak az N-terminálison acilezett vagy szabad N-terminálisú pentapeptideknek az MTT tesztben mutatott védő hatását mutatja be, amelyek önmagukban nem voltak toxikusak: RIIGL<sub>a</sub>, DIIGL<sub>a</sub>, Gaba-IIGL<sub>a</sub>, KIIGL<sub>a</sub>, Ac-RIIGL<sub>a</sub>, Pr-RIIGL<sub>a</sub>, nicotinoil-RIIGL<sub>a</sub> (Nic), riiGL<sub>a</sub>, RIIPL<sub>a</sub>, RII(NMe)GL<sub>a</sub>, RVVGV<sub>a</sub>, RAAGA<sub>a</sub>, RGGGG<sub>a</sub>, Pr-RIIPL<sub>a</sub>, rIIPL<sub>a</sub>, Pr-rIIPL<sub>a</sub>. A Dec-, Mir-, PhPr-, Nic-, Nal-RIIGL<sub>a</sub> származékok nem voltak hatásosak.



**23. ábra** Az önmagukban nem neurotoxikus peptidek A $\beta$ (1-42)vel együtt mutatott életképességi eredményei differenciált SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteken MTT tesztben.

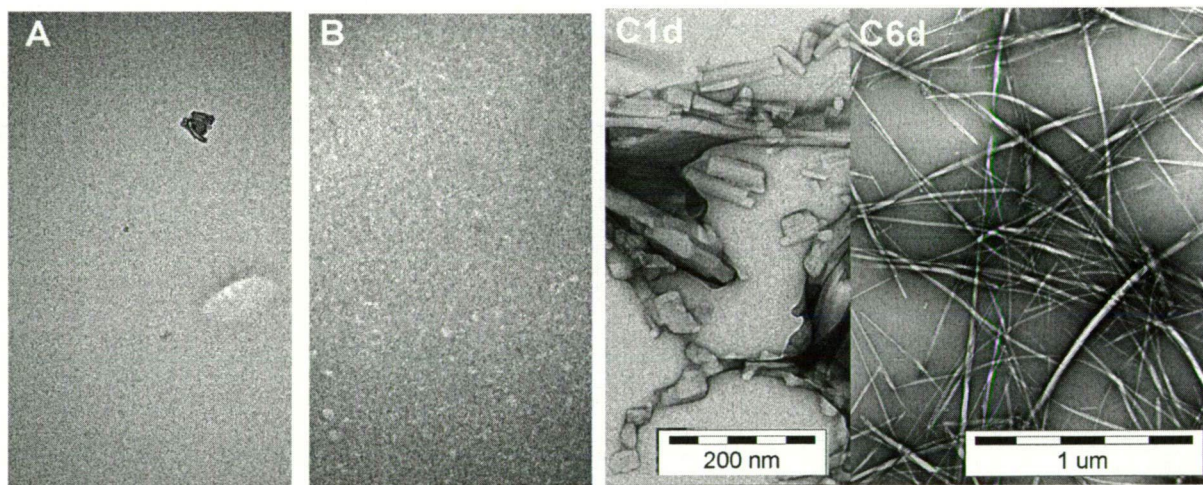
A Pr-IIGL<sub>a</sub> vízzoldhatóvá tett, Arg-t tartalmazó származékai közül érdekes módon a szabad N-terminálisú RIIGL<sub>a</sub> védte ki legnagyobb mértékben MTT tesztben az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatását (**23. ábra**). Nagyhatású protektív peptidek közé azokat soroltuk, amelyek 80% fölötti életképességet mutattak az MTT tesztben. Mérsékelt védő hatásúaknak tekintettük a 60-80% viabilitásúakat és 60% alatt gyenge vagy nem védő hatásúak voltak a



peptidek. Az összes életképesség % értékek szignifikánsan különböztek mind a kontroll, mind az A $\beta$ (1-42) értékeitől.

### V. 3. 2. Aggregációs inhibítorok

A Pr-IIIGL<sub>a</sub> és RIIGL<sub>a</sub> aggregációját TEM-mel vizsgáltuk az A $\beta$ (31-35)<sub>a</sub>-et tekintve kontrollnak, mivel ez a peptid tartalmazza az IIIGL szekvenciát, de nincs neuroprotektív hatása [10]. A peptidek oldatait 1-6 napig inkubáltuk 37°C-on. A **24. ábrán** látható, hogy sem az A $\beta$ (31-35)<sub>a</sub>, sem az RIIGL<sub>a</sub> még 6 nap után sem aggregálódott (A és B ábra). Ezzel szemben a Pr-IIIGL<sub>a</sub> már 1 nap után 20-30 nm átmérőjű, legalább 200 nm hosszú lemezkéket alkotott (C1d) és 6 nap inkubálás után érett, rendezett fonatokat (2-3  $\mu$ m hosszú és 10-40 nm széles) alkotott és a rövid aggregátumok teljesen eltűntek a mintákból (C6d).



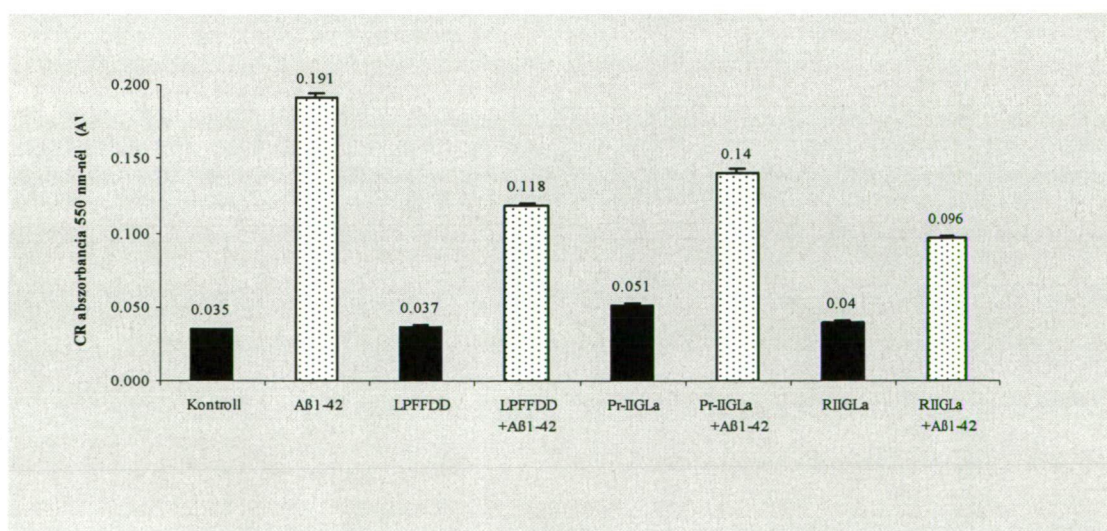
**24. ábra** TEM felvételek: (A) A $\beta$ (31-35)<sub>a</sub> és (B) RIIGL<sub>a</sub> 6 napig inkubálva 37 °C-n és Pr-IIIGL<sub>a</sub> (C1d) 1 napig és (C6d) 6 napig inkubálva 37 °C-on.

Az RIIGL<sub>a</sub> és származékai védő hatását azzal magyaráztuk, hogy megváltoztatják az aggregáció folyamatát azáltal, hogy az A $\beta$ (1-42) asszociátumok felszínéhez kötődnek és ezzel gátolják a további asszociátumok képződését [47], [51]. Ezt a folyamatot DLS vizsgálatokkal követtük. Két nap után, amikor az aggregátumok olyan nagyok lettek, hogy a DLS rendszerünkkel már nem tudtuk tovább követni, a TEM vizsgálatok nyújtottak kvalitatív információt a mintában történő aggregációról. A DLS vizsgálatok azt mutatták, hogy az RIIGL<sub>a</sub> képes megváltoztatni az A $\beta$ (1-42) aggregációs profilját. Egy nap után mind



az A $\beta$ (1-42)-t, mind az A $\beta$ (1-42)-t és RIIGL<sub>a</sub>-t tartalmazó minták két csúcsot tartalmazó méreteloszlást mutattak, de az RIIGL<sub>a</sub>-t is tartalmazó mintákban a protofibrilláris mérettartomány a kisebb mérettartomány felé volt eltolódva. Ez az eltolódás 2 nap után még nagyobb mértékű, mind a protofibrillumok, mind a fibrillumok a kisebb mérettartomány felé tolódtak el és az oligomer-protofibrilláris mérettartományban egy új csúcs is megjelent [16].

Az irodalomból jól ismert, klasszikus BSB pentapeptidnek, az LPFFD-nek és az RIIGL<sub>a</sub> és Pr-IIGL<sub>a</sub> peptidjeinknek az A $\beta$ (1-42) aggregációjára gyakorolt hatását összehasonlítottuk kongóvörös (CR) festék kötődési tesztben (25. ábra), valamint TEM és MTT vizsgálatokkal is. Az LPFFD<sub>a</sub> nem aggregálódott, de gátolta a CR kötődését az amiloid aggregátumokhoz és mérsékelt védő hatása volt az MTT tesztben. A Pr-IIGL<sub>a</sub> önmagában fibrilláris aggregátumokat képez, míg az RIIGL<sub>a</sub> nem képez fibrillumokat. Az aggregálódott Pr-IIGL<sub>a</sub> citotoxikus vegyületként viselkedik a neuroblasztoma sejteken, de az RIIGL<sub>a</sub> nem toxikus és A $\beta$ (1-42)-vel együtt vizsgálva gátolja az érett amiloid kötegek képződését. Ezáltal csökkenti a fibrilláris A $\beta$ (1-42) citotoxikus hatását az MTT tesztben és a CR-nek a kötődését is gátolta. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az RIIGL<sub>a</sub> mind az A $\beta$ (1-42) aggregációját, mind a toxikus hatását gátolja [10]. A Pr-csoport, amely dezamino-Ala<sup>30</sup>-nak tekinthető az A $\beta$  szekvenciában, növeli a molekula hidrofób jellegét és ez aggregációhoz és toxicitáshoz vezet. Egy Arg-t beépítve a molekulába, nemcsak az oldhatóság nőtt meg, hanem az RIIGL<sub>a</sub> igen hatásosan gátolta az amiloid aggregációját is. Az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy az A $\beta$ (31-35) szekvencia alapja lehet A $\beta$  aggregációt gátló vegyületek tervezésének.



**25. ábra** LPFFD, Pr-IIGL<sub>a</sub>, RIIGL<sub>a</sub> peptidek kötődése kongóvörös (CR) festékhez önmagukban és A $\beta$ (1-42)-vel együtt.

### V. 3. 3. $\beta$ -Szerkezetromboló (BSB) peptidek

Az irodalomból ismert  $\beta$ -szerkezet romboló peptidek hatását úgy képzelték el, hogy ezek a rövid molekulák az  $A\beta$  peptidekhez kötődve megakadályozzák a fibrillumok képződését. Az irodalomból ismert az  $A\beta(1-42)$  C-terminális részének a fontossága az amiloid plakkok kialakulása során az aggregációs csíra („seeding”) kialakulásában (212). Saját [41] és mások (213) eredményei is azt mutatták, hogy az  $A\beta(1-42)$  sokkal gyorsabban aggregál, mint a C-terminálison az Ile-Ala szekvenciával rövidebb  $A\beta(1-40)$ . Ezeket figyelembe véve előállítottuk az  $A\beta(1-42)$  C-terminális pentapeptidjét a GVVIA<sub>a</sub>, valamint az oldékonyság növelése céljából ennek a pentapeptidnek az N-terminálisán Arg-t tartalmazó RVVIA<sub>a</sub> peptideket. Mindkét vegyület részlegesen gátolta az  $A\beta(1-42)$ -nek SH-SY5Y sejtekre kifejtett neurotoxikus hatását, a kettő közül az RVVIA<sub>a</sub> volt a hatásosabb. Az FT-IR mérések eredményei azt mutatták, hogy az aggregátumok mennyisége csökkent, ha az  $A\beta(1-42)$  aggregációját ennek a 2 peptidnek bármelyikével együtt vizsgáltuk [52].

Az irodalomban korábban leírt LPFFD peptid BSB hatását sokan vizsgálták. Ennek a peptidnek a módosításával olyan származékot akartunk előállítani, amely izotóppal jelölhető, ezért a Phe helyére Tyr-t építettünk be a molekulába: LPFYD<sub>a</sub>, LPYFD<sub>a</sub>, LPYYD<sub>a</sub>. Ezek közül az LPYFD<sub>a</sub> MTT tesztben gátolta az  $A\beta(1-42)$  neurotoxikus hatását és a tau hiperfoszforilációt is [53]. Az LPYFD<sub>a</sub> szekvenciában megvizsgáltuk a többi aminosav kicserélhetőségét, ezért előállítottuk a következő molekulákat: APYFD<sub>a</sub>, VPYFD<sub>a</sub>, IPYFD<sub>a</sub>, LPYFA<sub>a</sub>, LPYFA, LPYF $\beta$ A, DFYPL<sub>a</sub> (fordított szekvencia), lpyfd<sub>a</sub> (csupa-D reverz), LPVA-PEA, Ac-PYFL<sub>a</sub>. A Pro-t (NMe)Gly-nel helyettesítve (L(NMe)GYFD<sub>a</sub>) megmarad ugyan a szekunder amino-csoport a molekulában, de valamivel nagyobb a konformációs szabadság, mint Pro esetén. Az RIIGL<sub>a</sub> és LPYFD<sub>a</sub> legrövidebb, még hatásos szekvenciájának megállapítása céljából előállítottuk az alábbi tripeptideket és ezek származékait:

a) Karboxamid C-terminálissal és szabad N-terminálissal: RLV, OLV, KLV, RLL, KVV, RVV, KPV, RPV, OPV, KVL, RVL, RII, RHD, YFY, EFE, RFR, GVV, GAI, GLM, GLV, KLV, PYF, HypFF

b) Karboxil C-terminálissal: YFY

c) Acilezett N-terminálissal: Hex-RII.

A peptidlánc további rövidítésével előállítottuk az alábbi dipeptideket is: Ac-Leu-Val-NH<sub>2</sub>, Cit-Leu-Val-NH<sub>2</sub>, Upr-Leu-Val-NH<sub>2</sub> (Upr=ureidopropionil)



Az MTT tesztben mutatott neuroprotektív hatásuk alapján az alábbi öt peptid 65 módosított származékát állítottuk elő: IPYFD<sub>a</sub>, Ac-PYFL<sub>a</sub>, LPYA-PEA, PYF<sub>a</sub>, HypFF<sub>a</sub>. Ezek az újabb származékok a következő módosításokat tartalmazzák: N-terminális acilezést, a C-terminálison  $\beta$ -feniletilamin és  $\alpha$ ,  $\omega$ -diaminok beépítését, a peptidlánc rövidítését és nem természetes, valamint D-aminosavak beépítését. A tetrapeptidekre és származékaikra a **Biogal-Teva Gyógyszergyárral** közös szabadalmat jelentettünk be „Peptides and peptidomimetics for the therapeutical treatment of neurodegenerative diseases associated with abnormal protein folding to amyloid-like deposits” címmel. Az előállított származékok közül a „P 29” és „P 59” számú vegyület mind *in vitro*, mind *in vivo* tesztekben teljes mértékben kivédte az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatását. Ezen vegyületek gyógyszerre fejlesztésének a megkezdése a Biogal-Teva döntésétől függ.

Az LPYFD<sub>a</sub>-t 5 equivalens feleslegben A $\beta$ (1-42)-vel 5 napig együtt inkubálva, majd TEM kísérletekben megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a mintákban az A $\beta$ (1-42) fibrillumokkal együtt jelen voltak nagy méretű, amorf mikroaggregátumok és kis méretű, flexibilis protofibrillumok. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az LPYFD<sub>a</sub> nemcsak mint BSB működik, hanem az A $\beta$ (1-42) hatását azáltal befolyásolja, hogy beborítja a fibrillumok felszínét és ezáltal megakadályozza az aggregátumok kölcsönhatását a sejt membrán fehérjével [54].

Az A $\beta$ (1-42) különböző szakaszainak az alábbi öt pentapeptid fragmensét ill. ezek analógiáit állítottuk elő: FRHDS<sub>a</sub> (A $\beta$ [4-8]), GRHDS<sub>a</sub> (A $\beta$ [4-8] analóg), LPYFD<sub>a</sub> (A $\beta$ [17-21 analóg]), RIIGL<sub>a</sub> (A $\beta$ [30-34 analóg]), RVVIA<sub>a</sub> (A $\beta$ [38-42] analóg) [55]. Neuroprotektív hatásukat MTT tesztben SH-SY5Y humán neuroblasztoma sejtenyészen, valamint patkány agykéregből nyert agyszeleten elektrofiziológiai mérésekkel *in vitro* és patkányokban multibarrel elektródok alkalmazásával *in vivo* vizsgáltuk. Az elektrofiziológiai vizsgálatokban az A $\beta$ (1-42)-t és a vizsgált pentapeptidet ko-iontoforézissel juttattuk be a patkányok agyába vagy előre elkészített keveréküket alkalmaztuk. Érdekes módon az FRHDS<sub>a</sub> csak akkor volt hatásos, ha ko-iontoforézissel juttattuk be, keverékben való bejuttatás esetén nem mutatott védő hatást. Az FRHDS<sub>a</sub> és a GRHDS<sub>a</sub> integrin típusú receptorhoz kötődő ligandok. Az RVVIA<sub>a</sub> gyenge védő hatású peptidnek mutatkozott az MTT tesztben, az elektrofiziológiai mérésekben pedig nem mutatott védő hatást. Az LPYFD<sub>a</sub> és az RIIGL<sub>a</sub> képes megvédeni a neuronokat az A $\beta$  peptidek hatásától azáltal, hogy az A $\beta$ (1-42) fibrillumokhoz kötődnek. Az LPYFD<sub>a</sub> mind ko-iontoforézissel, mind keverékben védő hatású volt, az RIIGL<sub>a</sub> viszont csak keverék formájában védett az A $\beta$ (1-42) neuromoduláló hatása ellen. Ez az eltérés azzal

magyarázható, hogy lényegesen különbözik az az idő, amennyit az A $\beta$ (1-42) és a vizsgált peptid találkozik: ko-iontoforézissel történő bejuttatás esetén ez nagyon rövid idő, míg a keveréket 1 óra előinkubálás után juttatva be, a védő peptid hosszabb ideig találkozik az A $\beta$  protofibrillumokkal és fibrillumokkal. Ko-iontoforézis esetén a rövid idő nem elegendő arra, hogy az RIIGL<sub>a</sub> befedje az A $\beta$  fibrillumok felszínét, de az 1 órás előinkubálás elegendő az A $\beta$  fibrillumok felszínének beborításához és így az A $\beta$ (1-42) fibrillumok neuromoduláló hatása nem tud érvényesülni [18]. Feltételezésünk szerint az LPYFD<sub>a</sub> gyorsan reagál az A $\beta$  protofibrillumokkal és fibrillumokkal, ezért ennél a peptidnél a kezelés módja nem befolyásolja a védő hatást.

Az A $\beta$ (1-42) szekvenciában négy neuroprotektív családot találtunk: A $\beta$ [4-8], A $\beta$ [17-21], A $\beta$ [30-34] és A $\beta$ [38-42]. Ezek a rövid peptidek feltételezésünk szerint képesek az amiloid aggregátumok felszínéhez kötődni (A $\beta$ -aggregate surface binding peptides, ASBIM) és ezáltal védik meg a neuronokat az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatásától [56].

### **V. 3. 4. Az endomorfín-2 védő hatása**

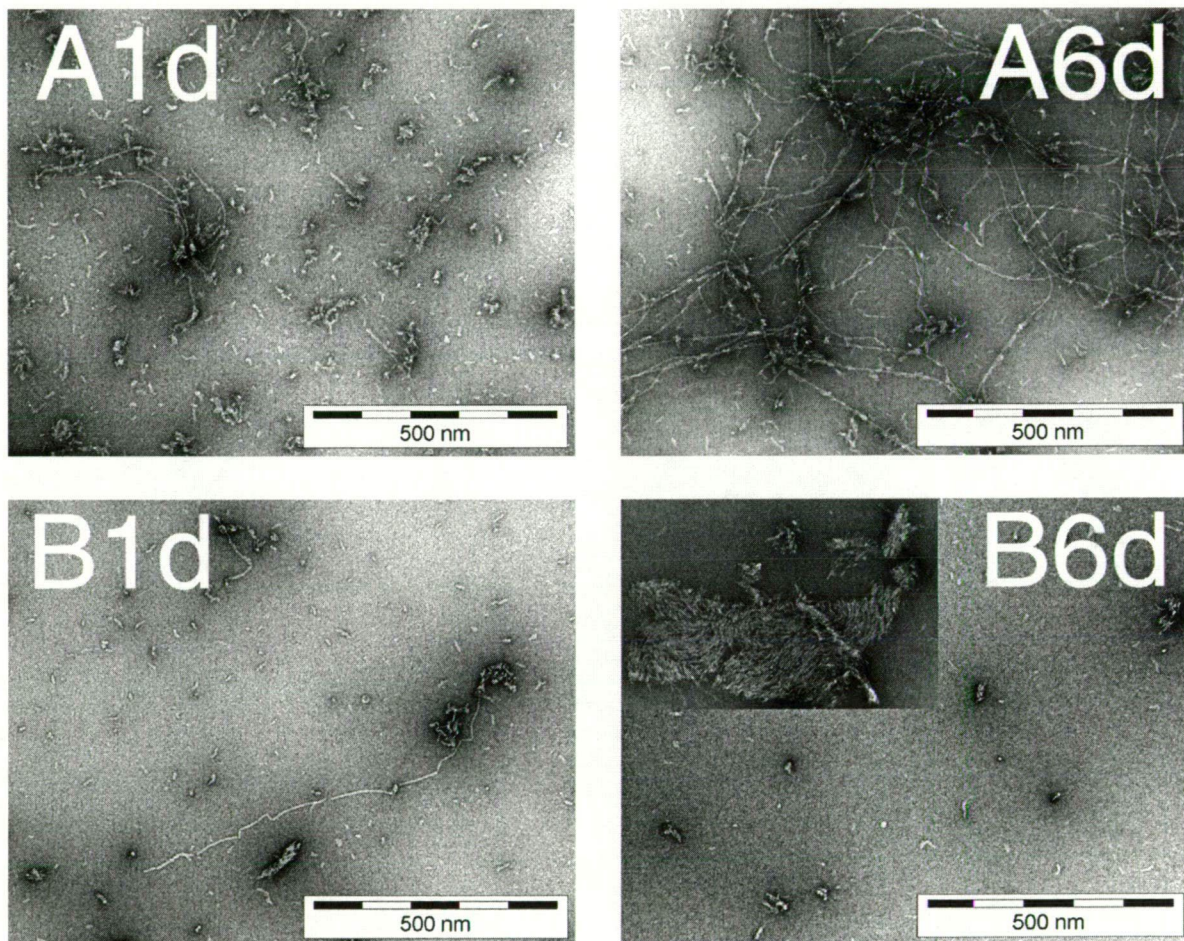
Az agyban található endogén peptidek közül egyet, az endomorfín-2-t (YPFF) is megvizsgáltuk *in vitro* és *in vivo*, hogy képes-e megvédeni az idegsejteket az A $\beta$ (1-42) toxikus hatásától. Annak ellenére, hogy a TEM vizsgálatok eredménye szerint az YPFF nem befolyásolta a fibrillum képződés folyamatát, az *in vitro* MTT tesztben és *in vivo* elektrofiziológiai vizsgálatokban dózis-függő neuroprotektív hatást mutatott [57]. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a fibrillációs folyamatok nem minden esetben befolyásolják közvetlenül az A $\beta$  neurotoxikus hatását.

## **V. 4. HATÁSMECHANIZMUS**

### **V. 4. 1. RIIGL<sub>a</sub> hatása az aggregációra**

A Pr-IIIGL<sub>a</sub> peptid előállításakor és vizsgálata során még azt gondoltuk, hogy ez a molekula valamilyen receptoron keresztül fejti ki a védő hatását. Közben egyre

szaporodtak az adatok, amelyek azt a feltételezést támogatták, hogy az amiloid aggregációs inhibítorként viselkedő rövid peptidek azáltal képesek befolyásolni az  $A\beta(1-42)$  aggregációját, hogy az aggregátumok felszínéhez kötődnek és ezáltal megakadályozzák a további aggregációt [10]. Ezt a hipotézist a TEM vizsgálatok tették láthatóvá. A 26. ábra az  $A\beta(1-42)$  aggregációját mutatja be önmagában és RIIGL<sub>a</sub> peptid jelenlétében (1:5 molarány).



**26. ábra**  $A\beta(1-42)$  aggregációja önmagában (A1d) és RIIGL<sub>a</sub> peptid jelenlétében TEM felvételeken 1 napig (B1d) és 6 napig (A6d és B6d) 37 °C-n inkubálva

Mindkét mintában megjelentek 1 nap után a fibrilláris aggregátumok (A1d, B1d), de különbségek mutatkoztak: A) az  $A\beta(1-42)$  oldatában szabálytalan, darabos, esetenként elágazó, 10-100 nm hosszú és 6-8 nm széles protofibrillumok és néhány 200-400 nm hosszú, egyenes fibrillum látható (A1d); B) az  $A\beta(1-42)$  és RIIGL<sub>a</sub> elegyét tartalmazó mintában a fenti szerkezetek mellett néhány érett amiloid szál (strand) is megjelent (B1d).

Még nagyobb volt a 2 minta között az aggregációs folyamat különbsége 6 nap után. A kizárólag A $\beta$ (1-42)-t tartalmazó minta elsősorban érett, 2-3  $\mu$ m hosszú rostokat tartalmazott (A6d), míg a két peptid elegyét tartalmazó minta TEM felvételén látható, hogy a RIIGL<sub>a</sub> megakadályozta az amiloid fibrillumok képződését (B6d). Ebben a mintában csak szórványosan szétoszlott szabálytalan 10-40 nm hosszú protofibrillumok, valamint 0.5-2  $\mu$ m átmérőjű, amorf, nem-fibrilláris mikroaggregátumok találhatók. Mivel az A $\beta$  oligomerek is toxikusak, a neuroprotektív hatású peptideknek az oligomer, protofibrillum és fibrillum képződést kell megakadályozni és ezek különböző vegyületek lehetnek.

#### **V. 4. 2. A $\beta$ kölcsönhatása sejtmembránokkal, szignalizáció**

Az A $\beta$  membránokhoz kötődése kritikus lépésnek tűnik az AD-hoz vezető események sorában. A biokémiai kapcsolat a membrán és A $\beta$  között kétirányú. Az A $\beta$  bizonyos membrán fehérjékhez kötődése védő hatású lehet a sejt számára, pl. az A $\beta$  adhézio, internalizáció és lebomlás mediálása révén. Ezekben a folyamatokban fellépő zavar AD kifejlődéséhez vezethet. Másrészt az A $\beta$  membránnal való kapcsolata toxicitáshoz is vezethet, pl. a membránfluiditás vagy a membrán szerkezetének megváltozása, az idegsejtek plazma membránjából felszabaduló lipidek vagy ioncsatornák képzése révén. Az A $\beta$  bizonyos fehérjékhez kötődve a tau hiperfoszforilációjának kiváltása, oxidatív stressz és a makrofágok stimulálása révén is ártalmas lehet a sejtekre [5].

Az irodalomból ismert, hogy peptidek aminosavszekvenciájának megfordítása nagy változást okoz a peptid konformációjában (214). A fordított szekvenciájú A $\beta$ (42-1) nem mutat  $\beta$ -redőzött szerkezetet és nagyon csekély tendenciát mutat aggregációra és a neurotoxicitása is minimális, tehát a peptid szerkezete, az aggregáció és toxicitás jó korellációban vannak egymással [44]. Hipotézisünk szerint a neurotoxikus kaszkád első lépése az enzimrezisztens, aggregált A $\beta$  peptideknek APP-hez, integrinekhez és más receptorokhoz való kapcsolódása.

## VI AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

Az általunk tervezett és előállított GH-RH antagonistákra négy USA és három nemzetközi szabadalmi bejelentést tettünk. Az elvégzett preklinikai vizsgálatok alapján az alábbi 5 antagonistát lett kiválasztva további fejlesztésre:

### MZ-J-7-118

[Oct<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ala<sup>8</sup>, His<sup>9</sup>, Tyr(Et)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>

### MZ-J-7-132

[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Har<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Abu<sup>15</sup>, His<sup>20</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>

### MZ-J-7-138

[Oct<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Ala<sup>8</sup>, His<sup>9</sup>, Tyr(Et)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup>, Orn<sup>12</sup>, Abu<sup>15</sup>, His<sup>20</sup>, Orn<sup>21</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>

### MZ-J-7-114

[Oct<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Amp<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>

### JV-1-68

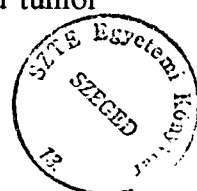
[PhAc<sup>0</sup>, D-Arg<sup>2</sup>, Cpa<sup>6</sup>, Amp<sup>9</sup>, Abu<sup>15</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>28</sup>, Har<sup>29</sup>]hGH-RH(1-29)NH<sub>2</sub>

Amennyiben a klinikai vizsgálatok is eredményesek lesznek, az öt GH-RH antagonistát egyikéből új rákellenes gyógyszer fejleszthető ki. A fejlesztést a **Zentaris GmbH** (Frankfurt, Németország) végzi.

Az LPYFD<sub>a</sub>-ból kiindulva tervezett és előállított Aβ tetrapeptidek és származékaik közül 60 vegyületre a **Biogal-Teva Gyógyszergyárral** közös szabadalmat jelentettünk be. Az előállított származékok közül a „P 29” és „P 59” számú vegyület mind *in vitro*, mind *in vivo* tesztekben teljes mértékben kivédte az Aβ(1-42) neurotoxikus hatását. Ezeknek a vegyületeknek a gyógyszerre fejlesztésének megkezdése a Biogal-Teva döntésétől függ.

## VII ÖSSZEFOGLALÁS

1. Több mint százötven új GH-RH antagonistát terveztünk és állítottunk elő. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg és az újabb antagonistákat mindig ezek figyelembevételével terveztük.
2. A számos új GH-RH antagonista szerkezet-hatás összefüggéseiből az alábbi következtetések vonhatók le: 1) a molekula N-terminálisán nem elágazó (Oct) vagy elágazó szénláncú (Ibu) zsírsavval, valamint egy aromás gyűrűt tartalmazó savval (PhAc) történő acilezés fokozza az antagonista aktivitást *in vitro* és *in vivo*; 2) a C-terminálison mind a dezkarboxi-Arg (Agm), mind a D-Arg<sup>28</sup>-Har<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub> helyettesítések növelik az *in vitro* és *in vivo* antagonista hatást; 3) a molekula szekvenciájában a Cpa<sup>6</sup>, Abu<sup>15</sup>, Amp<sup>9</sup> vagy His<sup>9</sup>, Tyr(Me)<sup>10</sup> vagy Tyr(Et)<sup>10</sup>, His<sup>11</sup> és His<sup>20</sup> is aktivitás növekedést eredményez.
3. A fenti helyettesítésekkel az irodalomban korábban leírt és kereskedelmi forgalomban lévő GH-RH antagonistánál *in vitro* 2 nagyságrenddel aktívabb és elnyújtott hatású vegyületeket állítottunk elő. Az új antagonisták receptor kötődései néhány kivételtől eltekintve jó egyezést mutattak a GH-RH által *in vitro* indukált GH felszabadulás gátlásával.
4. Néhány peptid *in vivo* patkány kísérletekben a standardnál legalább 20-szor nagyobb mértékben gátolta a GH-RH által indukált GH felszabadulást.
5. Elsőként bizonyítottuk az új, nagyhatású peptidjeinkkel, hogy egyes tumorok proliferációja eredményesen gátolható GH-RH antagonistákkal. Immunhiányos egereken végzett onkológiai tesztekben a tumorok tömege és térfogata szignifikánsan csökkent a GH-RH antagonista kezelés hatására.
6. Megállapítottuk, hogy GH-RH antagonistával történő kezelés az IGF-I és IGF-II szintek szignifikáns csökkenését eredményezi tumorokban.
7. A hipofízis GH-RH receptort, egyik splice variánsát (SV<sub>1</sub>) és mindkettőt felismerő poliklonális antitestet állítottunk elő.
8. A hatásmechanizmus tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a korábban feltételezett indirekt gátláson kívül az antagonista peptidek a tumorokban lévő GH-RH receptorokon keresztül közvetlenül is gátolják a tumorok növekedését.
9. A nagyhatású GH-RH antagonista peptidek alapját képezhetik egy új típusú tumor ellenes gyógyszer kifejlesztésének.





10. Kidolgoztuk az A $\beta$ (1-42) racionális szintézisét Fmoc-stratégiával. Az A $\beta$ (1-42) peptidnek az előállítás során a hordozón bekövetkező aggregációját 10% anizolt tartalmazó DMF/DCM oldószer elegy alkalmazásával sikerült megakadályoznunk. Ez az optimális kapcsolási körülmény növelte a nyers A $\beta$ (1-42) tisztaságát és a termelést.
11. Biológiai vizsgálatok céljára előállítottuk a még szilárd hordozón lévő A $\beta$ (1-42) és néhány fragmense AMCA és FAM fluoreszcens jelölt származékát, valamint FITC jelölt származékát oldat fázisban. Kidolgoztunk egy hasító koktélt, amellyel a jelölt származékok hordozóról történő hasítása után Met-szulfoxid nélküli terméket kaptunk.
12. Megvizsgáltuk patkány asztroglia sejtenyészen fluoreszcencia mérésekkel és SH-SY5Y neuroblasztoma sejtenyészen MTT teszttel az előállított A $\beta$ (1-42) peptid és rövidebb fragmensei - A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (31-35) - neurotoxikus hatását.
13. Az előállított A $\beta$  peptidek toxicitás és aggregáció közötti kölcsönhatását FT-IR, TEM és DLS *in vitro* módszerekkel tanulmányoztuk. A vizsgálati eredményekből megállapítottuk, hogy 1) az összes vizsgált peptid szolvatált monomer formában van DMSO vagy HFIP oldatokban még 20 mg/ml koncentrációban is, 2) az aggregáció szekvencia függő, az A $\beta$ (1-42) aggregálódik leggyorsabban, már 1 napig tartó ú.n. „öregítés” 20 °C-on csaknem teljes aggregációt eredményez, 3) az aggregáció elkezdődéséhez a kritikus koncentráció  $2.5 \times 10^{-5}$  M vizes oldatban.
14. Az aggregációs vizsgálatok eredményei és az MTT-teszttel mért neurotoxicitás mértéke jól korelláltak egymással.
15. Elsőként állítottunk elő ú.n. funkcionális antagonistá vegyületet (Pr-IIIGL<sub>a</sub>), amely *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is gátolta az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatását.
16. A vízoldható és neuroprotektív RIIGL<sub>a</sub> peptid alapján terveztünk és előállítottunk 30-35 új pentapeptid származékot, amelyekbe D-konfigurációjú, valamint néhány nem természetes aminosavat is beépítettünk az enzimrezisztencia fokozása céljából.
17. Az RIIGL<sub>a</sub> és származékai védő hatását azzal magyaráztuk, hogy megváltoztatják az aggregáció folyamatát azáltal, hogy az A $\beta$ (1-42) asszociátumok felszínéhez kötődnek és ezzel gátolják a további asszociátumok képződését.
18. A klasszikus BSB pentapeptidnek, az LPFFD-nek az általunk előállított analógjai közül, az LPYFD<sub>a</sub> és ennek két tetrapeptid („29” és „59”) származéka az *in vitro* és *in vivo* tesztekben is teljes mértékben kivédte az A $\beta$ (1-42) neurotoxikus hatását.

19. Az előállított származékok közül a „P 29” és „P 59” számú vegyületek alapját képezhetik egy olyan új gyógyszer kifejlesztésének, amely képes lehet a már kifejlődött AD esetén a kórfolyamat megállítására.



## VIII IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Merrifield, R. B.; Solid phase peptide synthesis. 1. Synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149.
- (2) Loffet, A.; Peptides as drugs: Is there a market?, *Journal of Peptide Science*, **2002**, *8*, 1-7.
- (3) Bajusz, S.; Kovacs, M.; Gazdag, M.; Bokser, L.; Karashima, T.; Csernus, V. J.; Janaky, T.; Guoth, J.; Schally, A. V.; Highly potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 1637-1641.
- (4) Bajusz, S.; Josef Rudinger Memorial Lecture 2002 - Peptide related drug research, *J. Peptide Sci.*, **2003**, *9*, 321-332.
- (5) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M.; Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study., *Lancet*, **2005**, *366*, 2112-2117.
- (6) Evans, D. A.; Funkenstein, H. H.; Albert, M. S.; Scherr, P. A.; Cook, N. R.; Chown, M. J.; Hebert, L. E.; Hennekens, C. H.; Taylor, J.; Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported., *JAMA*, **1989**, *262*, 2551-2556.
- (7) Turner, R. S.; Alzheimer's disease., *Semin Neurol.*, **2006**, *26*, 499-506.
- (8) Matsuo, H.; Baba, Y.; Nair, R. M.; Arimura, A.; Schally, A. V.; Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, *43*, 1334-1339.
- (9) Baba, Y.; Matsuo, H.; Schally, A. V.; Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analysis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, *44*, 459-463.
- (10) Schally, A.; Arimura, A.; Kastin, A. J.; Matsuo, H.; Baba, Y.; Radding, T. W.; Nair, R. M.; Debeljuk, L.; White, W.; Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones., *Science*, **1971**, *173*, 1036-1038.
- (11) Burgus, R.; Butcher, M.; Amoss, M.; Ling, N.; Monahan, M. W.; Rivier, J.; Fellows, R.; Blackwell, R.; Vale, W.; Guillemin, R.; Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1972**, *69*, 278-282.
- (12) Schally, A. V.; Arimura, A.; Bowers, C. Y.; Wakabayashi, I.; Kastin, A. J.; Redding, T. W.; Mittler, J. C.; Nair, R. M.; Pizzolato, P.; Segal, A. J.; Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1970**, *31*, 291-300.
- (13) Guillemin, R.; Brazeau, P.; Bohlen, P.; Esch, F.; Ling, N.; Wehrenberg, W. B.; Growth hormone- releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly, *Science*, **1982**, *218*, 585-587.
- (14) Rivier, J.; Spiess, J.; Thorner, M.; Vale, W.; Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour, *Nature*, **1982**, *300*, 276-278.
- (15) Rivier, J.; Spiess, J.; Vale, W.; Human and rat hypothalamic growth hormone releasing factors (GRF). *Peptides*, **1983**, 853-856.

- (16) Ling, N.; Esch, F.; Bohlen, P.; Brazeau, P.; Wehrenberg, W. B.; R, G.; Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocrinin-growth hormone-releasing factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1984**, *81*, 4302-4306.
- (17) Frohman, L. A.; Jansson, J. O.; Growth hormone-releasing hormone, *Endocr. Rew.*, **1986**, *7*, 223-253.
- (18) Suhr, S. T.; Rahal, J. O.; Mayo, K. E.; Mouse growth hormone-releasing hormone-precursor structure and expression in brain and placenta, *Mol. Endocrin.*, **1989**, *3*, 1693-1700.
- (19) Bagnato, A.; Moretti, C.; Ohnishi, J.; Frajese, G.; Catt, K. J.; Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary, *Endocrinology*, **1992**, *130*, 1092-1102.
- (20) Pescovitz, O. H.; Berry, S. A.; Laudon, M.; Benjonathan, N.; Martinmyers, A.; Hsu, S. M.; Lambros, T. J.; Felix, A. M.; Localization and growth-hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide, *Endocrinology*, **1990**, *127*, 2336-2342.
- (21) Bosman, F. T.; Vanassche, C.; Kruseman, A. C. N.; Jackson, S.; Lowry, P. J.; Growth-hormone-releasing-factor (GRF) immunoreactivity in human and rat gastrointestinal-tract and pancreas, *J. Histochem. & Cytochem.*, **1984**, *32*, 1139-1144.
- (22) Vance, M. L.; Growth Hormone-Releasing Hormone, *Clin. Chem.*, **1990**, *36*, 415-420.
- (23) Zarandi, M.; Csernus, V.; Bokser, L.; Bajusz, S.; Groot, K.; Schally, A. V.; Synthesis and *in vitro* and *in vivo* activity of analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) with C-terminal agmatine, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1990**, *36*, 499-505.
- (24) Zarandi, M.; Serfozo, P.; Zsigo, J.; Bokser, L.; Janaky, T.; Olsen, D. B.; Bajusz, S.; Schally, A. V.; Potent agonists of growth hormone-releasing hormone. 1., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1992**, *39*, 211-217.
- (25) Schally, A. V.; Hypothalamic hormones: from neuroendocrinology to cancer therapy., *Anti Cancer Drugs*, **1994**, *5*, 115-130.
- (26) Robberecht, P.; H, C. D.; Walelbroeck, M.; Structural requirements for the activation of rat anterior-pituitary adenylate-cyclase by growth hormone-releasing factor (GRF) - discovery of (N-Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Arg<sup>2</sup>)-GRF(1-29)-NH<sub>2</sub> as a GRF Antagonist on membranes, *Endocrinology*, **1985**, *117*, 1759-1764.
- (27) Lumpkin, M. D.; Mulroney, S. E.; Haramati, A.; Inhibition of pulsatile growth-hormone (GH) secretion and somatic growth in immature rats with a synthetic GH-releasing factor antagonist  
*Endocrinology*, **1989**, *124*, 1154-1159.
- (28) Lumpkin, M. D.; McDonald, M. K.; Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF antagonist, *Endocrinology*, **1989**, *124*, 1522-1531.
- (29) Pollak, M. N.; Polychronakos, C.; Richard, M.; Insulin-like growth factor-I - a potent mitogen for human osteogenic-sarcoma, *J. Natl. Canc. Inst.*, **1990**, *82*, 301-305.
- (30) Schally, A. V.; Varga, J. L.; Antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone: New potential antitumor agents, *Trends in Endocrinol. & Metab.*, **1999**, *10*, 383-391.
- (31) Chan, J. M.; Stampfer, M. J.; Giovannucci, E.; Gann, P. H.; Ma, J.; Wilkinson, P.; Hennekens, C. H.; Pollak, M. N.; Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study., *Science*, **1998**, *279*, 563-566.

- (32) Hankinson, S. E.; Willett, W. C.; Colditz, G. A.; Hunter, D. J.; Michaud, D. S.; Deroo, B.; Rosner, B.; Speizer, F. E.; Pollak, M.; Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer., *Lancet*, **1998**, *351*, 1393-1396.
- (33) Moschos, S. J.; Mantzoros, C. S.; The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications., *Oncology*, **2002**, *63*, 317-332.
- (34) Pollak, M. N.; Schernhammer, E. S.; Hankinson, S. E.; Insulin-like growth factors and neoplasia, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *47*, 505-518.
- (35) Schally, A. V.; Kovacs, M.; Toth, K.; Comaru-Schally, A. M.; Antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH): Endocrine and oncological studies, *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, **1998**, 145-162.
- (36) OcampoLim, B.; Guo, W. S.; DeMottFriberg, R.; Barkan, A. L.; Jaffe, C. A.; Nocturnal growth hormone (GH) secretion is eliminated by infusion of GH-Releasing hormone antagonist, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1996**, *81*, 4396-4399.
- (37) Jaffe, C. A.; DeMottFriberg, R.; Frohman, L. A.; Barkan, A. L.; Suppression of growth hormone (GH) hypersecretion due to ectopic GH-releasing hormone (GHRH) by a selective GHRH antagonist, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1997**, *82*, 634-637.
- (38) Weckbecker, G.; Raulf, F.; Bodmer, D.; Bruns, C.; Indirect antiproliferative effect of the somatostatin analog octreotide on MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma in nude mice., *Yale. J. Biol. Med.*, **1997**, *70*, 594-554.
- (39) Pollak, M. N.; Polychronakos, C.; Guyda, H.; Somatostatin analog SMS 201-995 reduces serum IgF-I levels in patients with neoplasms potentially dependent on IgF-I *Anticanc. Res.*, **1989**, *9*, 889-891.
- (40) Mayo, K. E.; Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone, *Mol. Endocrin.*, **1992**, *6*, 1734-1744.
- (41) Gaylinn, B. D.; Harrison, J. K.; Zysk, J. R.; Lyons, C. E.; Lynch, K. R.; Thorner, M. O.; Molecular cloning and expression of a human anterior-pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone, *Mol. Endocrin.*, **1993**, *7*, 77-84.
- (42) Gaylinn, B. D.; Lyons, C. E.; Zysk, J. R.; Clarke, I. J.; Thorner, M. O.; Photoaffinity crosslinking to the pituitary receptor for growth hormone-releasing factor, *Endocrinology*, **1994**, *135*, 950-955.
- (43) Matsubara, S.; Sato, M.; Mizobuchi, M.; Niimi, M.; Takahara, J.; Differential gene-expression of growth-hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH-receptors in various rat-tissues, *Endocrinology*, **1995**, *136*, 4147-4150.
- (44) Kahan, Z.; Arencibia, J. M.; Csernus, V. J.; Groot, K.; Kineman, R. D.; Robinson, W. R.; Schally, A. V.; Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1999**, *84*, 582-589.
- (45) Asa, S. L.; Kovacs, K.; Thorner, M. O.; Leong, D. A.; Rivier, J.; Vale, W.; Immunohistological localization of growth hormone-releasing hormone in human tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1985**, *60*, 423-427.
- (46) Rekasi, Z.; Varga, J. L.; Schally, A. V.; Halmos, G.; Armatis, P.; Groot, K.; Czompoly, T.; Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers., *Endocrinology*, **2000**, *141*, 2120-2128.
- (47) Jungwirth, A.; Schally, A. V.; Pinski, J.; Groot, K.; Armatis, P.; Halmos, G.; Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits in vivo proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1997**, *94*, 5810-5813.

- (48) Lamharzi, N.; Schally, A. V.; Koppan, M.; Groot, K.; Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-5-156 inhibits growth of DU-145 human androgen-independent prostate carcinoma in nude mice and suppresses the levels and mRNA expression of insulin-like growth factor II in tumors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, *95*, 8864-8868.
- (49) Kiaris, H.; Schally, A. V.; Varga, J. L.; Groot, K.; Armatis, P.; Growth hormone-releasing hormone: An autocrine growth factor for small cell lung carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1999**, *96*, 14894-14898.
- (50) Szepeshazi, K.; Schally, A. V.; Groot, K.; Armatis, P.; Hebert, F.; Halmos, G.; Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit in vivo proliferation of experimental pancreatic cancers and decrease IGF-II levels in tumours, *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 128-136.
- (51) Kahan, Z.; Varga, J. L.; Schally, A. V.; Rekasi, Z.; Armatis, P.; Chatzistamou, L.; Czompoly, T.; Halmos, G.; Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice., *Breast Cancer Res. Treat.*, **2000**, *60*, 71-79.
- (52) Tang, J. Q.; Lagace, G.; Castagne, J.; Collu, R.; Identification of human growth hormone-releasing hormone-receptor splicing variants, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1995**, *80*, 2381-2387.
- (53) Hashimoto, K.; Koga, M.; Motomura, T.; Kasayama, S.; Kouhara, H.; Ohnishi, T.; Arita, N.; Hayakawa, T.; Sato, B.; Kishimoto, T.; Identification of alternatively spliced messenger-ribonucleic-acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone-receptor in human pituitary-adenomas, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1995**, *80*, 2933-2939.
- (54) Netchine, I.; Talon, P.; Dastot, F.; Vitaux, F.; Goossens, M.; Amselem, S.; Extensive phenotypic analysis of a family with Growth Hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **1998**, *83*, 432-436.
- (55) Rekasi, Z.; Czompoly, T.; Schally, A. V.; Halmos, G.; Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 10561-10566.
- (56) Halmos, G.; Schally, A. V.; Czompoly, T.; Krupa, M.; Varga, J. L.; Rekasi, Z.; Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **2002**, *87*, 4707-4714.
- (57) Busto, R.; Schally, A. V.; Varga, J. L.; Garcia-Fernandez, M. O.; Groot, K.; Armatis, P.; Szepeshazi, K.; The-expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 11866-11871.
- (58) Alzheimer, A.; Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allg. Z. Psychiatr-Gerich. Med.*, **1907**, *64*, 146-148.
- (59) Davies, L.; Wolska, B.; Hilbich, C.; Multhaup, G.; Martins, R.; Simms, G.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques, *Neurology*, **1988**, *38*, 1688-1693.
- (60) Mayeux, R.; Epidemiology of neurodegeneration., *Annu. Rev. Neurosci.*, **2003**, *26*, 81-104.
- (61) Mortimer, J. A.; Snowdon, D. A.; Markesbery, W. R.; Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study, *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, **2003**, *25*, 671-679.

- (62) Jellinger, K. A.; Head injury and dementia., *Curr. Opin. Neurol.*, **2004**, *17*, 719-723.
- (63) Gatz, M.; Reynolds, C. A.; Fratiglioni, L.; Johansson, B.; Mortimer, J. A.; Berg, S.; Fiske, A.; Pedersen, N. L.; Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease., *Arch. Gen. Psychiatry*, **2006**, *63*, 168-174.
- (64) Glenner, G. G.; Wong, C. W.; Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, *120*, 885-890.
- (65) Shirahama, T.; Cohen, A. S.; High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril., *J. Cell. Biol.*, **1967**, *33*, 679-708.
- (66) Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; M, Q.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I.; Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 4913-4917.
- (67) El Khoury, J.; Hickman, S. E.; Thomas, C. A.; Cao, L.; Silverstein, S. C.; Loike, J. D.; Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils., *Nature*, **1996**, *382*, 716-719.
- (68) Paresce, D. M.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R.; Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor., *Neuron*, **1996**, *17*, 553-565.
- (69) Yan, S. D.; Chen, X.; Fu, J.; Chen, M.; Zhu, H.; Roher, A.; Slattery, T.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Morser, J.; Migheli, A.; Nawroth, P.; Stern, D.; Schmidt, A. M.; RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease., *Nature*, **1996**, *382*, 685-691.
- (70) Du, Y.; Ni, B.; Glinn, M.; Dodel, R. C.; Bales, K. R.; Zhang, Z.; Hyslop, P. A.; Paul, S. M.; alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein., *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 299-305.
- (71) Yan, S. D.; Fu, J.; Soto, C.; Chen, X.; Zhu, H.; Al-Mohanna, F.; Collison, K.; Zhu, A.; Stern, E.; Saido, T.; Tohyama, M.; Ogawa, S.; Roher, A.; Stern, D.; An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease, *Nature*, **1997**, *389*, 689-695.
- (72) Pillot, T.; Goethals, M.; Najib, J.; Labeur, C.; Lins, L.; Chambaz, J.; Brasseur, R.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Beta-amyloid peptide interacts specifically with the carboxy-terminal domain of human apolipoprotein E: relevance to Alzheimer's disease., *J. Neurochem.*, **1999**, *72*, 230-237.
- (73) Wang, H. Y.; Lee, D. H.; Davis, C. B.; Shank, R. P.; Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors., *J. Neurochem.*, **2000**, *75*, 1155-1161.
- (74) Marchesi, V. T.; An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2005**, *102*, 9093-9098.
- (75) Arispe, N.; Rojas, E.; Pollard, H. B.; Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1993**, *90*, 567-571.
- (76) Behl, C.; Davis, J. B.; Lesley, R.; Schubert, D.; Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity., *Cell*, **1994**, *77*, 817-827.
- (77) Sastre, M.; Klockgether, T.; Heneka, M. T.; Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms., *Int J Dev Neurosci.*, **2006**, *24*, 167-176.

- (78) Thomas, T.; Thomas, G.; McLendon, C.; Sutton, T.; Mullan, M.; beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage., *Nature*, **1996**, *380*, 168-171.
- (79) Goedert, M.; Spillantini, M. G.; A century of Alzheimer's disease., *Science*, **2006**, *314*, 777-781.
- (80) Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K.; Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1985**, *82*, 4245-4249.
- (81) Haass, C.; Schlossmacher, M. G.; Hung, A. Y.; Vigo-Pelfrey, C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B. L.; Lieberburg, I.; Koo, E. H.; Schenk, D.; Teplow, D. B.; Dennis, J.; Selkoe, D. J.; Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism., *Nature*, **1992**, *359*, 322-325.
- (82) Nukina, N.; Ihara, Y.; One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein., *J. Biochem. (Tokyo)*, **1986**, *99*, 1541-1544.
- (83) Matsuzaki, H.; Tamatani, M.; Yamaguchi, A.; Namikawa, K.; Kiyama, H.; Vitek, M. P.; Mitsuda, N.; Tohyama, M.; Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades., *FASEB J.*, **2001**, *15*, 1218-1220.
- (84) Yang, S. P.; Bae, D. G.; Kang, H. J.; Gwag, B. J.; Ghoo, Y. S.; Chae, C. B.; Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease., *Neurobiol. Aging*, **2004**, *25*, 283-290.
- (85) Hashimoto, T.; Wakabayashi, T.; Watanabe, A.; Kowa, H.; Hosoda, R.; Nakamura, A.; Kanazawa, I.; Arai, T.; Takio, K.; Mann, D. M.; Iwatsubo, T.; CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV., *EMBO J.*, **2002**, *21*, 1524-1534.
- (86) Soderberg, L.; Dahlqvist, C.; Kakuyama, H.; Thyberg, J.; Ito, A.; Winblad, B.; Naslund, J.; Tjernberg, L. O.; Collagenous Alzheimer amyloid plaque component assembles amyloid fibrils into protease resistant aggregates., *FEBS J.*, **2005**, *272*, 2231-2236.
- (87) Selkoe, D. J.; Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease., *Curr Opin Neurobiol.*, **1994**, *4*, 708-716.
- (88) Esch, F. S.; Keim, P. S.; Beattie, E. C.; Blacher, R. W.; Culwell, A. R.; Oltersdorf, T.; McClure, D.; Ward, P. J.; Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor., *Science*, **1990**, *248*, 1122-1124.
- (89) Selkoe, D. J.; Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein., *Annu. Rev. Neurosci.*, **1994**, *17*, 489-517.
- (90) Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M.; Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE., *Science*, **1999**, *286*, 735-741.
- (91) Sun, X.; He, G.; Qing, H.; Zhou, W.; Dobie, F.; Cai, F.; Staufenbiel, M.; Huang, L. E.; Song, W.; Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2006**, *103*, 18727-18732.
- (92) Wolfe, M. S.; Xia, W.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Kimberly, W. T.; Selkoe, D. J.; Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity., *Nature*, **1999**, *398*, 513-517.
- (93) De Strooper, B.; Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex., *Neuron*, **2003**, *38*, 9-12.

- (94) Parvathy, S.; Hussain, I.; Karran, E. H.; Turner, A. J.; Hooper, N. M.; Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 9728-9734.
- (95) Roher, A. E.; Chaney, M. O.; Kuo, Y. M.; Webster, S. D.; Stine, W. B.; Haverkamp, L. J.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Tuohy, J. M.; Krafft, G. A.; Bonnell, B. S.; Emmerling, M. R.; Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 20631-20635.
- (96) Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B.; Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates., *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 25945-25952.
- (97) Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L.; Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 6448-6453.
- (98) Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Vigo-Pelfrey, C.; Kasunic, T. C.; Kirkpatrick, J. B.; Murdoch, G. H.; Ball, M. J.; Roher, A. E.; Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 4077-4081.
- (99) Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L.; Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 10417-10422.
- (100) Klein, W. L.; Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets., *Neurochem. Int.*, **2002**, *41*, 345-352.
- (101) Lesne, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H.; A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory., *Nature*, **2006**, *440*, 352-357.
- (102) Gouras, G. K.; Tsai, J.; Naslund, J.; Vincent, B.; Edgar, M.; Checler, F.; Greenfield, J. P.; Haroutunian, V.; Buxbaum, J. D.; Xu, H.; Greengard, P.; Relkin, N. R.; Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain., *Am. J. Pathol.*, **2000**, *156*, 15-20.
- (103) Barghorn, S.; Nimmrich, V.; Striebinger, A.; Krantz, C.; Keller, P.; Janson, B.; Bahr, M.; Schmidt, M.; Bitner, R. S.; Harlan, J.; Barlow, E.; Ebert, U.; Hillen, H.; Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease., *J. Neurochem.*, **2005**, *95*, 834-847.
- (104) Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, J.; Masters, C. L.; Beyreuther, K.; Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides., *J. Mol. Biol.*, **1992**, *228*, 460-473.
- (105) Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehook, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C.; A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation., *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 12619-12625.
- (106) Talaga, P.; Beta-amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality?, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2001**, *1*, 175-186.
- (107) Tjernberg, L. O.; Naslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlstrom, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; C, N.; Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand.. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 8545-8548.

- (108) Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B.; Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, 226, 672-680.
- (109) Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castano, E. M.; Frangione, B.; Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy., *Nat. Med.*, **1998**, 4, 822-826.
- (110) Carson, J. A.; Turner, A. J.; Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?, *J. Neurochem.*, **2002**, 81, 1-8.
- (111) Tanzi, R. E.; Moir, R. D.; Wagner, S. L.; Clearance of Alzheimer's A $\beta$  peptide: the many roads to perdition., *Neuron*, **2004**, 43, 605-608.
- (112) Hardy, J. A.; Higgins, G. A.; Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis., *Science*, **1992**, 256, 184-185.
- (113) Hardy, J.; Selkoe, D. J.; The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics., *Science*, **2002**, 297, 353-356.
- (114) Hardy, J. A.; Higgins, G. A.; Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis., *Science*, **2004**, 256, 184-185.
- (115) Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N.; Bird, T. D.; Hardy, J.; Hutton, M.; Kukull, W.; Larson, E.; Levy-Lahad, E.; Viitanen, M.; Peskind, E.; Poorkaj, P.; Schellenberg, G.; Tanzi, R.; Wasco, W.; Lannfelt, L.; Selkoe, D.; S, Y.; Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease., *Nat. Med.*, **1996**, 2, 864-870.
- (116) Head, E.; Lott, I. T.; Down syndrome and beta-amyloid deposition., *Curr. Opin. Neurol.*, **2004**, 17, 95-100.
- (117) Rovelet-Lecrux, A.; Hannequin, D.; Raux, G.; Le Meur, N.; Laquerriere, A.; Vital, A.; Dumanchin, C.; Feuillet, S.; Brice, A.; Vercelletto, M.; Dubas, F.; Frebourg, T.; Campion, D.; APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy., *Nat. Genet.*, **2006**, 38, 24-26.
- (118) Permann, B.; Adessi, C.; Saborio, G. P.; Fraga, S.; Frossard, M. J.; Van Dorpe, J.; Dewachter, I.; Banks, W. A.; Van Leuven, F.; Soto, C.; Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide., *FASEB J.*, **2002**, 16, 860-862.
- (119) Rogers, J.; Cooper, N. R.; Webster, S.; Schultz, J.; McGeer, P. L.; Styren, S. D.; Civin, W. H.; Brachova, L.; Bradt, B.; Ward, P.; Lieberburg, I.; Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1992**, 89, 10016-10020.
- (120) Giulian, D.; Haverkamp, L. J.; Li, J.; Karshin, W. L.; Yu, J.; Tom, D.; Li, X.; Kirkpatrick, J. B.; Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain., *Neurochem. Int.*, **1995**, 27, 119-137.
- (121) Delacourte, A.; Buee, L.; Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders., *Curr. Opin. Neurol.*, **2000**, 13, 371-376.
- (122) Nagy, Z.; Esiri, M. M.; Jobst, K. A.; Morris, J. H.; King, E. M.; McDonald, B.; Litchfield, S.; Smith, A.; Barnett, L.; Smith, A. D.; Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria., *Dementia*, **1995**, 6, 21-31.
- (123) Mufson, E. J.; Chen, E. Y.; Cochran, E. J.; Beckett, L. A.; Bennett, D. A.; Kordower, J. H.; Entorhinal cortex beta-amyloid load in individuals with mild cognitive impairment., *Exp. Neurol.*, **1999**, 158, 469-490.
- (124) Wilcock, G. K.; Esiri, M. M.; Plaques, tangles and dementia. A quantitative study., *J. Neurol. Sci.*, **1982**, 56, 343-356.



- (125) Goedert, M.; Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease., *Trends Neurosci.*, **1993**, *16*, 460-465.
- (126) de la Torre, J. C.; Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence., *Stroke*, **2002**, *33*, 1152-1162.
- (127) Kalara, R. N.; Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations., *Cerebrovasc. Dis.*, **2002**, *13*, 48-52.
- (128) Zlokovic, B. V.; Deane, R.; Sallstrom, J.; Chow, N.; Miano, J. M.; Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide., *Brain Pathol.*, **2005**, *15*, 78-83.
- (129) de la Torre, J.; Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis., *Ann N Y Acad Sci.* *1.*, **2002**, *977*, 196-215.
- (130) Hentschel, F.; Supprian, T.; Frolich, L.; Alzheimer's disease versus vascular dementia -- dichotomy or interaction?], *Fortschr. Neurol. Psychiatr.*, **2005**, *73*, 317-326.
- (131) Regan, C.; Katona, C.; Walker, Z.; Hooper, J.; Donovan, J.; Livingston, G.; Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease., *Neurology*, **2006**, *67*, 1357-1362.
- (132) Nagy, Z.; Esiri, M. M.; Smith, A. D.; The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease., *Neuroscience*, **1998**, *87*, 731-739.
- (133) Reisberg, B.; Franssen, E. H.; Souren, L. E.; Auer, S. R.; Akram, I.; Kenowsky, S.; Evidence and mechanisms of retrogenesis in Alzheimer's and other dementias: management and treatment import., *Am. J. Alzheimers Dis. Other. Demen.*, **2002**, *17*, 202-212.
- (134) Arendt, T.; Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang, *Prog. Neurobiol.*, **2003**, *71*, 83-248.
- (135) Nagy, Z.; Esiri, M. M.; Cato, A. M.; Smith, A. D.; Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease., *Acta Neuropathol. (Berl)*. **1997**, *94*, 6-15.
- (136) Nagy, Z.; The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease., *J. Cell. Mol. Med.*, **2005**, *9*, 531-541.
- (137) Berke, S. J.; Paulson, H. L.; Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2003**, *13*, 253-261.
- (138) van Leeuwen, F. W.; Neuropeptide research discloses part of the secrets of Alzheimer's disease neuropathogenesis: state of the art 2004., *Neurosci. Lett.*, **2004**, *361*, 124-127.
- (139) Akiyama, H.; Barger, S.; Barnum, S.; Bradt, B.; Bauer, J.; Cole, G.; Cooper, N. R.; Eikelenboom, P.; Emmerling, M. R.; Fiebich, B. L.; Finch, C. E.; Frautschy, S.; Griffin, W. S.; Hampel, H.; Hull, M.; Landreth, G.; Lue, L.; Mrak, R.; Mackenzie, I. R.; McGeer, P. L.; O'Banion, M. K.; Pachter, J.; Pasinetti, G.; Plata-Salaman, C.; Rogers, J.; Rydel, R.; Shen, Y.; Streit, W.; Strohmeyer, R.; Tooyoma, I.; Van Muiswinkel, F. L.; Veerhuis, R.; Walker, D.; Webster, S.; Wegrzyniak, B.; Wenk, G.; Wyss-Coray, T.; Inflammation and Alzheimer's disease., *Neurobiol. Aging.*, **2000**, *21*, 383-421.
- (140) Verdier, Y.; Huszar, E.; Penke, B.; Penke, Z.; Woffendin, G.; Scigelova, M.; Fulop, L.; Szucs, M.; Medzihradszky, K.; Janaky, T.; Identification of synaptic plasma membrane proteins co-precipitated with fibrillar beta-amyloid peptide., *J. Neurochem.*, **2005**, *94*, 617-628.
- (141) Terry, A. V. J.; Buccafusco, J. J.; The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *306*, 821-827.

- (142) Mayeux, R.; Sano, M.; Treatment of Alzheimer's disease., *N. Engl. J. Med.*, **1999**, *341*, 1670-1679.
- (143) Bullock, R.; Touchon, J.; Bergman, H.; Gambina, G.; He, Y.; Rapatz, G.; Nagel, J.; Lane, R.; Rivastigmine and donepezil treatment in moderate to moderately-severe Alzheimer's disease over a 2-year period, *Curr. Med. Res. Opin.*, **2005**, *21*, 1317-1327.
- (144) Wilkinson, D.; Drugs for treatment of Alzheimer's disease., *Int. J. Clin. Pract.*, **2001**, *55*, 129-134.
- (145) Tariot, P. N.; Farlow, M. R.; Grossberg, G. T.; Graham, S. M.; McDonald, S.; Gergel, I.; Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial, *JAMA*, **2004**, *291*, 317-324.
- (146) Brodaty, H.; Ames, D.; Snowden, J.; Woodward, M.; Kirwan, J.; Clarnette, R.; Lee, E.; Lyons, B.; Grossman, F.; A randomized placebo-controlled trial of risperidone for the treatment of aggression, agitation, and psychosis of dementia, *J. Clin. Psychiatry*, **2003**, *64*, 134-143.
- (147) Chang, W. P.; Koelsch, G.; Wong, S.; Downs, D.; Da, H.; Weerasena, V.; Gordon, B.; Devasamudram, T.; Bilcer, G.; Ghosh, A. K.; Tang, J.; In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors, *J. Neurochem.*, **2004**, *89*, 1409-1416.
- (148) Petit, A.; Bihel, F.; Alves da Costa, C.; Pourquie, O.; Checler, F.; Kraus, J. L.; New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage., *Nat. Cell. Biol.*, **2001**, *3*, 507-511.
- (149) Etcheberrigaray, R.; Tan, M.; Dewachter, I.; Kuiperi, C.; Van der Auwera, I.; Wera, S.; Qiao, L.; Bank, B.; Nelson, T. J.; Kozikowski, A. P.; Van Leuven, F.; Alkon, D. L.; Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 11141-11146.
- (150) Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandevent, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P.; Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse., *Nature*, **1999**, *400*, 173-177.
- (151) Bard, F.; Cannon, C.; Barbour, R.; Burke, R. L.; Games, D.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Nguyen, M.; Soriano, F.; Vasquez, N.; Weiss, K.; Welch, B.; Seubert, P.; Schenk, D.; Yednock, T.; Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease., *Nat. Med.*, **2000**, *6*, 916-919.
- (152) Orgogozo, J. M.; Gilman, S.; Dartigues, J. F.; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C.; Jouanny, P.; Dubois, B.; Eisner, L.; Flitman, S.; Michel, B. F.; Boada, M.; Frank, A.; Hock, C.; Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization., *Neurology*, **2003**, *61*, 46-54.
- (153) Pappolla, M.; Bozner, P.; Soto, C.; Shao, H.; Robakis, N. K.; Zagorski, M.; Frangione, B.; Ghiso, J.; Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 7185-7188.
- (154) Salomon, A. R.; Marciniowski, K. J.; Friedland, R. P.; Zagorski, M. G.; Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 13568-13578.



- (155) Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M.; Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro., *J. Neurosci. Res.*, **2004**, *75*, 742-745.
- (156) Howlett, D. R.; Perry, A. E.; Godfrey, F.; Swatton, J. E.; Jennings, K. H.; Spitzfaden, C.; Wadsworth, H.; Wood, S. J.; Markwell, R. E.; Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a novel series of benzofurans., *Biochem. J.*, **1999**, *340*, 283-289.
- (157) Tomiyama, T.; Asano, S.; Suwa, Y.; Morita, T.; Kataoka, K.; Mori, H.; Endo, N.; Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid beta protein in vitro., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *204*, 76-83.
- (158) Sadowski, M.; Pankiewicz, J.; Scholtzova, H.; Ripellino, J. A.; Li, Y.; Schmidt, S. D.; Mathews, P. M.; Fryer, J. D.; Holtzman, D. M.; Sigurdsson, E. M.; Wisniewski, T.; A synthetic peptide blocking the apolipoprotein E/beta-amyloid binding mitigates beta-amyloid toxicity and fibril formation in vitro and reduces beta-amyloid plaques in transgenic mice., *Am. J. Pathol.*, **2004**, *165*, 937-948.
- (159) van Horssen, J.; Wesseling, P.; van den Heuvel, L. P.; de Waal, R. M.; Verbeek, M. M.; Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders, *Lancet Neurol.*, **2003**, *2*, 482-492.
- (160) Cherny, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Volitakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice, *Neuron.*, **2001**, *30*, 665-676.
- (161) Iqbal, K.; Alonso Adel, C.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I.; Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies., *Biochim. Biophys. Acta.*, **2005**, *1739*, 198-210.
- (162) Broe, G. A.; Grayson, D. A.; Creasey, H. M.; Waite, L. M.; Casey, B. J.; Bennett, H. P.; Brooks, W. S.; Halliday, G. M.; Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer disease at low doses., *Arch. Neurol.*, **2000**, *57*, 1586-1591.
- (163) Ohkura, T.; Isse, K.; Akazawa, K.; Hamamoto, M.; Yaoi, Y.; Hagino, N.; Evaluation of estrogen treatment in female patients with dementia of the Alzheimer type., *Endocr. J.*, **1994**, *41*, 361-371.
- (164) Le Bars, P. L.; Kieser, M.; Itil, K. Z.; 26-week analysis of a double-blind, placebo-controlled trial of the ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **2000**, *11*, 230-237.
- (165) Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R. G.; Klauber, M. R.; Schafer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growdon, J.; Cotman, C. W.; Pfeiffer, E.; Schneider, L. S.; Thal, L. J.; A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study., *N. Engl. J. Med.*, **1997**, *336*, 1216-1222.
- (166) Puglielli, L.; Tanzi, R. E.; Kovacs, D. M.; Alzheimer's disease: the cholesterol connection., *Nature Neurosci.*, **2003**, *6*, 345-351.
- (167) Wolozin, B.; Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease., *Neuron*, **2004**, *41*, 7-10.
- (168) Simons, M.; Keller, P.; De Strooper, B.; Beyreuther, K.; Dotti, C. G.; Simons, K.; Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, *95*, 6460-6464.

- (169) Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lutjohann, D.; Keller, P.; Runz, H.; Kuhl, S.; Bertsch, T.; von Bergmann, K.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; Hartmann, T.; Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta - amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2001**, *98*, 5856-5861.
- (170) Sjogren, M.; Blennow, K.; The link between cholesterol and Alzheimer's disease., *World J. Biol. Psychiatry*, **2005**, *6*, 85-97.
- (171) Abad-Rodriguez, J.; Ledesma, M. D.; Craessaerts, K.; Perga, S.; Medina, M.; Delacourte, A.; Dingwall, C.; De Strooper, B.; Dotti, C. G.; Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation, *J. Cell Biol.*, **2004**, *167*, 953-960.
- (172) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.; Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.
- (173) Kates, S. A.; de la Torre, B. G.; Eritja, R.; Albericio, F.; Solid-phase N-glycopeptide synthesis using allyl side-chain protected Fmoc-amino acids, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 1033-1034.
- (174) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid., *Anal. Biochem.*, **1985**, *150*, 76-85.
- (175) Vigh, S.; Schally, A. V.; Interaction between hypothalamic peptides in a superfused pituitary cell system., *Peptides*, **1984**, *5*, 241-247.
- (176) Rekasi, Z.; Schally, A. V.; A method for evaluation of activity of antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone in a superfusion system., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1993**, *90*, 2146-2149.
- (177) Csernus, V. J.; Schally, A. V.; The dispersed cell superfusion system., In: *Neuroendocrine Research Methods*, (Ed. Greenstein, B. D.), Harwood Academic Publishers, London, **1991**, 71-109.
- (178) Halmos, G.; Rekasi, Z.; Szoke, B.; Schally, A. V.; Use of radioreceptor assay and cell superfusion system for in vitro screening of analogs of growth hormone-releasing hormone., *Receptor*, **1993**, *3*, 87-97.
- (179) McPherson, G. A.; Analysis of radioligand binding experiments. A collection of computer programs for the IBM PC., *J. Pharmacol. Methods*, **1985**, *14*, 213-228.
- (180) Rekasi, Z.; Varga, J. L.; Schally, A. V.; Plonowski, A.; Halmos, G.; Csernus, B.; Armatis, P.; Groot, K.; Antiproliferative actions of growth hormone-releasing hormone antagonists on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells involve cAMP independent pathways., *Peptides*, **2001**, *22*, 879-886.
- (181) Breier, B. H.; Gallaher, B. W.; Gluckman, P. D.; Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls., *J. Endocrinol.*, **1991**, *128*, 347-357.
- (182) Datki, Z.; Juhasz, A.; Galfi, M.; Soos, K.; Papp, R.; Zadori, D.; Penke, B.; Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells., *Brain Res. Bull.*, **2003**, *62*, 223-229.
- (183) Szereday, Z.; Schally, A. V.; Varga, J. L.; Kanashiro, C. A.; Hebert, F.; Armatis, P.; Groot, K.; Szepeshazi, K.; Halmos, G.; Busto, R.; Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the proliferation of experimental non-small cell lung carcinoma., *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 7913-7919.
- (184) Hohla, F.; Schally, A. V.; Szepeshazi, K.; Varga, J. L.; Buchholz, S.; Koster, F.; Heinrich, E.; Halmos, G.; Rick, F. G.; Kannadka, C.; Datz, C.; Kanashiro, C. A.;

- Synergistic inhibition of growth of lung carcinomas by antagonists of growth hormone-releasing hormone in combination with docetaxel., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2006**, *103*, 14513-14518.
- (185) Pinski, J.; Schally, A. V.; Jungwirth, A.; Groot, K.; Halmos, G.; Armatis, P.; Zarandi, M.; VadilloBuenfil, M.; Inhibition of growth of human small cell and non-small cell lung carcinomas by antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH), *Int. J. Onc.*, **1996**, *9*, 1099-1105.
- (186) Kanashiro, C. A.; Schally, A. V.; Groot, K.; Armatis, P.; Bernardino, A. L.; Varga, J. L.; Inhibition of mutant p53 expression and growth of DMS-153 small cell lung carcinoma by antagonists of growth hormone-releasing hormone and bombesin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2003**, *100*, 15836-15841.
- (187) Pour, P.; Mohr, U.; Cardesa, A.; Althoff, J.; Kruger, F. W.; Pancreatic Neoplasms in animal model - morphological, biological and comparative studies, *CANCER*, **1975**, *36*, 379-389.
- (188) Sato, K.; Hotta, M.; Kageyama, J.; Chiang, T. C.; Hu, H. Y.; Dong, M. H.; Ling, N.; Synthesis and in vitro bioactivity of human growth hormone-releasing factor analogs substituted with a single D-amino acid., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, *149*, 531-537.
- (189) Hruby, V. J.; Strategies in the development of peptide antagonists., *Prog. Brain. Res.*, **1992**, *92*, 215-224.
- (190) Hruby, V. J.; Designing peptide receptor agonists and antagonists., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 847-858.
- (191) Kaiser, E. T.; Kezdy, F. J.; Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones., *Science*, **1984**, *223*, 249-255.
- (192) Gennigens, C.; Menetrier-Caux, C.; Droz, J. P.; Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2006**, *58*, 124-145.
- (193) Jungwirth, A.; Schally, A. V.; Pinski, J.; Halmos, G.; Groot, K.; Armatis, P.; Vadillo-Buenfil, M.; Inhibition of in vivo proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone., *Br. J. Cancer*, **1997**, *75*, 1585-1592.
- (194) Izdebski, J.; Pinski, J.; Horvath, J. E.; Halmos, G.; Groot, K.; Schally, A. V.; Synthesis and biological evaluation of superactive agonists of growth hormone-releasing hormone., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1995**, *92*, 4872-4876.
- (195) Felix, A. M.; Heimer, E. P.; Wang, C. T.; Lambros, T. J.; Fournier, A.; Mowles, T. F.; Maines, S.; Campbell, R. M.; Wegrzynski, B. B.; Toome, V.; Fry, D.; Madison, V. S.; Synthesis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1988**, *32*, 441-454.
- (196) Chatzistamou, I.; Schally, A. V.; Varga, J. L.; Groot, K.; Busto, R.; Armatis, P.; Halmos, G.; Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone., *Anticancer Drugs*, **2001**, *12*, 761-768.
- (197) Plonowski, A.; Schally, A. V.; Letsch, M.; Krupa, M.; Hebert, F.; Busto, R.; Groot, K.; Varga, J. L.; Inhibition of proliferation of PC-3 human prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone: lack of correlation with the levels of serum IGF-I and expression of tumoral IGF-II and vascular endothelial growth factor., *Prostate*, **2002**, *52*, 173-182.
- (198) Kurtzhals, P.; Havelund, S.; Jonassen, I.; Markussen, J.; Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long-acting, acylated insulin analogue, *J. Pharmaceut. Sci.*, **1997**, *86*, 1365-1368.

- (199) Dasgupta, P.; Singh, A.; Mukherjee, R.; N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells., *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, *25*, 29-36.
- (200) Schally, A. V.; Varga, J. L.; Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology., *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **2006**, *9*, 163-170.
- (201) Kiaris, H.; Chatzistamou, I.; Schally, A. V.; Halmos, G.; Varga, J. L.; Koutselini, H.; Kalofoutis, A.; Ligand-dependent and -independent effects of splice variant 1 of growth hormone-releasing hormone receptor., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2003**, *100*, 9512-9517.
- (202) Khandwala, H. M.; McCutcheon, I. E.; Flyvbjerg, A.; Friend, K. E.; The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth., *Endocr. Rev.*, **2000**, *21*, 215-244.
- (203) Richman, R. A., *Handbook of Physiology: Hormonal Control of Growth*, **1999**, pp. 701-736.
- (204) Chopin, L. K.; Herington, A. C.; A potential autocrine pathway for growth hormone releasing hormone (GHRH) and its receptor in human prostate cancer cell lines., *Prostate*, **2001**, *49*, 116-121.
- (205) Schally, A. V.; Comaru-Schally, A. M.; Nagy, A.; Kovacs, M.; Szepeshazi, K.; Plonowski, A.; Varga, J. L.; Halmos, G.; Hypothalamic hormones and cancer, *Front. Neuroend.*, **2001**, *22*, 248-291.
- (206) Benlot, C.; Levy, L.; Fontanaud, P.; Roche, A.; Rouannet, P.; Joubert, D.; Somatostatin and growth hormone-releasing hormone in normal and tumoral human breast tissue: endogenous content, in vitro pulsatile release, and regulation., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1997**, *82*, 690-696.
- (207) Plonowski, A.; Schally, A. V.; Busto, R.; Krupa, M.; Varga, J. L.; Halmos, G.; Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of GHRH receptors in human experimental prostate cancers, *Peptides*, **2002**, *23*, 1127-1133.
- (208) Kineman, R.; Antitumorigenic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2000**, *97*, 532-534.
- (209) Sjogren, K.; Liu, J. L.; Blad, K.; Skrtic, S.; Vidal, O.; Wallenius, V.; LeRoith, D.; Tornell, J.; Isaksson, O. G.; Jansson, J. O.; Ohlsson, C.; Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1999**, *96*, 7088-7092.
- (210) Gray, C. W.; Patel, A. J.; Neurodegeneration mediated by glutamate and beta-amyloid peptide: a comparison and possible interaction., *Brain Res.*, **1995**, *691*, 169-179.
- (211) Huang, H.; Rabenstein, D. L.; A cleavage cocktail for methionine-containing peptides., *J. Pept. Res.*, **1999**, *53*, 548-553.
- (212) Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T.; The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4693-4697.
- (213) Snyder, S. W.; Lador, U. S.; Wade, W. S.; Wang, G. T.; Barrett, L. W.; Matayoshi, E. D.; Huffaker, H. J.; Krafft, G. A.; Holzman, T. F.; Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths., *Biophys. J.*, **1994**, *67*, 1216-1228.
- (214) Bhattacharyya, J.; Sharma, K. K.; Conformational specificity of mini-alphaA-crystallin as a molecular chaperone., *J. Pept. Res.*, **2001**, *57*, 428-434.

## IX KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki tanítómestereimnek, Széll Tamás egyetemi tanárnak, aki egyetemista éveim végén a kutató munka felé irányított és Penke Botond akadémikus, egyetemi tanárnak, aki később a peptidkémiai megismerését velem, értékes tanácsaival segítette szakmai fejlődésemet és külföldi partnereimmel a kapcsolattartást támogatta.

Nagyra értékelem és nagyon köszönöm Tóth Gábor tanszékvezető egyetemi tanárnak a támogatását, hasznos javaslatait és azt a biztatást, amelynek eredményeképp ez az értekezés elkészült.

Pályámat nagymértékben befolyásolta a Nobel-díjas Andrew V. Schally professzor (Tulane Egyetem, New Orleans, LA, USA), aki munkacsoportjában nagyfokú kutatási önállóságot biztosított számomra. Köszönettel tartozom a kutatócsoportjában dolgozó biológus partnereknek, akik az új peptidek széleskörű biológiai vizsgálatát elvégezték és akikkel eredményes együttműködést sikerült kialakítani.

Ezúton köszönöm Nagy Katalinnak és Ferenci Richárdnak az értékes segítségüket, amelyet az értekezésben összefoglalt munkámban nyújtottak, valamint az SZTE Orvosi Vegytani Intézet valamennyi munkatársának és volt Ph.D. hallgatóinknak a közvetlen vagy közvetett segítséget és támogatást, köztük elsősorban Fülöp Líviának, Jost Krisztinának, Varga Józsefnek, Datki Zsoltnak és Szegedi Viktornak.

Hálával tartozom gyermekeimnek, családomnak és barátaimnak az őszinte szeretetért és a kitartó támogatásért.